# HISTOAUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PROLIFERATION VON M–PROSPERMATOGONIEN UND OOGONIEN WÄHREND DER PRÄNATALEN ENTWICKLUNG DER WEISSEN MAUS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
KARL–JOSEF ALTMAIER
aus Bensberg

Bonn 1977

# HISTOAUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PROLIFERATION VON M–PROSPERMATOGONIEN UND OOGONIEN WÄHREND DER PRÄNATALEN ENTWICKLUNG DER WEISSEN MAUS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
KARL–JOSEF ALTMAIER
aus Bensberg

Bonn 1977

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Wartenberg
2. Gutachter: **Prof. Dr. H. J. Födisch**

Tag der mündlichen Prüfung: 7.6. 1977

Aus dem Anatomischen Institut
der Universität Bonn

Direktoren: Prof. Dr. K. Fleischhauer
Prof. Dr. H. Wartenberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhalt


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | Einleitung | 4 |
| II. | Material und Methode | 10 |
| | 1. Durchführung der Tierversuche und histologische Präparation der Organe | 10 |
| | 2. Autoradiographische Technik | 14 |
| | 3. Färbungen | 16 |
| | 4. Auswertung der Autoradiogramme | 19 |
| III. | Ergebnisse | 23 |
| | 1. Histologische Befunde über die Entwicklung der Gonaden vom 12. Tag p.c., 20 Uhr bis zum 16. Tag p.c., 20 Uhr | 23 |
| | 2. Ergebnisse der Quantitativ-Histologischen Untersuchungen | 30 |
| | 3. Ergebnis der Photometrischen Messung | 35 |
| IV. | Diskussion | 43 |
| V. | Zusammenfassung | 48 |
| VI. | Literaturverzeichnis | 49 |
| VII. | Lebenslauf | 59 |

## I. Einleitung

Seit über einem Jahrhundert ist die Gametogenese Gegenstand intensiver Forschung und vieler Kontroversen. Bereits 1870 beobachtete Waldeyer Geschlechtszellen im Coelomepithel der Urogenitalfalte und folgerte daraus, daß die Eizellen wie auch die frühen Spermatogonien innerhalb der Gonadenanlage, im sogenannten "Keimepithel" entstehen.
Nußbaum (1880) entwickelte dagegen die These von der Kontinuität der Geschlechtszellen, die sich nach seinen Beobachtungen direkt von einer der Furchungszellen ableiten sollten. Bald stellte sich aber heraus, daß die Keimbahn (Weismann, 1885) bei den Säugern nicht in der von Nußbaum angenommenen Vollständigkeit nachweisbar ist, da die Wanderung der Urkeimzellen nur von der Wand des Dottersackes, nahe der Allantois, über das Darm-Entoderm und das dorsale Mesenterium des Enddarms in die Region der Genitalleisten verfolgt werden kann.
In den folgenden Jahren wurde von vielen Forschern Weg und Schicksal der Keimzellen vieler Vertebraten, auch des Menschen (Witschi 1948), untersucht. Der erste experimentelle Beweis einer extragonadalen Entstehung der Geschlechtszellen beim Säugetier gelang Everett (1943) an der Maus. Auch durch selektive Darstellung der alakalischen Phosphatase in den Keimzellen konnten diese erkannt und ihr Weg lichtmikroskopisch verfolgt werden (Mc Kay et al., 1953; Chiquoine, 1954 und Mintz, 1959).
Verschiedene Aspekte der Gametogenese der Maus wurden im wesentlichen von Kingery (1917), Simkins (1923), Brambell (1927), Everett (1943), Borum (1961) und Spiegelmann et al. (1973) histologisch untersucht und beschrieben.
Diskutiert wurde vor allem auch die Frage, ob die primordialen Geschlechtszellen der weiblichen Gonade die direkten Vorläufer der definitiven Oocyten darstellen, oder ob diese später als eine zweite Generation - etwa nach der Pubertät - neu entstünden (Winiwarter et al., 1909).

Mit Hilfe der Technik der Histoautoradiographie (Rudkin et al., 1962; Peters et al., 1962; Borum, 1966) konnte nachgewiesen werden, daß die endgültige Zahl der Eizellen pränatal, oder bei einigen Säugern wie Kaninchen (Kennely et al., 1966; Peters et al., 1965) und Hamster (Weakley, 1967; Challoner, 1974) auch in den ersten Tagen postnatal festgelegt wird. Bei allen Säugern ist also die Oogenese im engeren Sinne, d. h. die Eibildung durch mitotische Proliferation spätestens kurz nach der Geburt beendet.

In den letzten Jahren befaßten sich viele Untersucher mit unterschiedlichen Problemen der Gonadenentwicklung. Im Vordergrund standen cytologische Untersuchungen mit Hilfe der Semidünnschnitttechnik und der Elektronenmikroskopie (Baker et al., 1967; Franchi et al., 1962, 1964; Odor et al., 1969, 1970; Wartenberg et al., 1971; Wartenberg, 1974, 1976; Vossmeyer, 1971), Untersuchungen über die Kinetik der Gametogenese, vor allem über die Dauer der prämeiotischen S-Phase der Oocyten, mit Hilfe der autoradiographischen Technik (Crone et al., 1965; Lima-De-Faria et al., 1962; Mauléon, 1967; Peters et al., 1967; Hilscher et al., 1968; Hilscher et al., 1971; Hilscher et al., 1974; Hilscher et al., 1976), sowie Untersuchungen quantitativer Art.
Diese quantitativen Arbeiten befaßten sich im wesentlichen mit der Entwicklung des Gonadenvolumens und der Keimzellzahl während der Gonienproliferation sowie dem zeitlichen Ablauf von Oogenese und meiotischer Prophase (Beaumont et al., 1962, 1963; Baker et al., 1966).
Detaillierte Darstellungen der Probleme der Gametogenese-Forschung und umfassende Literaturangaben finden sich bei Baker (1972 a und b), Falin (1969), Zuckermann (1960) und Peters (1971, 1976).

Aufgrund der vergleichenden cytologischen Untersuchungen der Gametogenese des Menschen und verschiedener anderer Tierspecies (Wartenberg, 1974, 1976) und der Kinetik (Hilscher et al., 1974, 1976) konnte von beiden Autoren ein Schema der Gametogenese entwickelt und verschiedene Entwicklungsstadien der Geschlechtszellen neu definiert werden.

Da wir in unseren Untersuchungen die von diesen Autoren eingeführten Begriffe verwenden, soll das für die Ratte von Hilscher et al. (1974) und Hilscher et al. (1976) erarbeitete Schema der Gametogenese hier erläutert und in diesem Rahmen die Gametogenese der weißen Maus kurz beschrieben werden.
Wie Abb. 1 zeigt, teilen obengenannte Autoren die Gametogenese in drei Abschnitte ein: Die prägonadale Phase, die Präspermatogenese der männlichen bzw. Oogenese der weiblichen Gonade und, als dritte Phase, beim männlichen Tier die Spermatogenese und beim weiblichen die Follikulogenese.
In der prägonadalen Phase wandern die primordialen Geschlechtszellen in die Gonadenanlage ein. Bei der weißen Maus ist diese Wanderung um den 12. - 13. Tag post conceptionem beendet und die Geschlechtszellen befinden sich alle in der Gonade (Chiquoine, 1954). Unmittelbar danach setzt die Geschlechtsdifferenzierung in Hoden bzw. Ovar ein. Die primordialen Geschlechtszellen werden zu M-Prospermatogonien (multiplying prospermatogonium, ursprünglich von Hilscher et al. (1968) I-Gonocyt und von Wartenberg et al. (1971) fetale Spermatogonie genannt) im Hoden und zu Oogonien im Ovar. Damit ist die prägonadale Phase beendet, die Gonade befindet sich in der Präspermatogenese bzw. Oogenese. Bei beiden Geschlechtern ist der Beginn des zweiten Abschnitts durch eine Phase lebhafter Proliferation, d. h. durch mehrere, schnelle und synchrone Teilungen der M-Prospermatogonien und Oogonien, gekennzeichnet. Die durch eine Gonienmitose entstehenden Tochterzellen bleiben durch Zellbrücken miteinander verbunden (Gondos et al., 1969; Ruby et al., 1969; Zamboni et al., 1968), sodaß Zellnester (Clone) entstehen, deren Entwicklung streng synchronisiert ist. Etwa am 15. - 16. Tag post conceptionem der Gonadenentwicklung werden bei der weißen Maus (Brambell, 1927; Borum, 1961 und Crone et al., 1965) die M-Prospermatogonien zu T1-Prospermatogonien (transitional prospermatogonium), die Oogonien zu Oocyten. Die Zellen der weiblichen Gonade treten in die Meiose ein und durchlaufen die Stadien der meiotischen Prophase, die T1-Prospermatogonien verharren in einer langen $G_1$-Phase (Ruhephase). In der Neonatalperiode werden sie zu T2-Prospermatogonien und es setzt

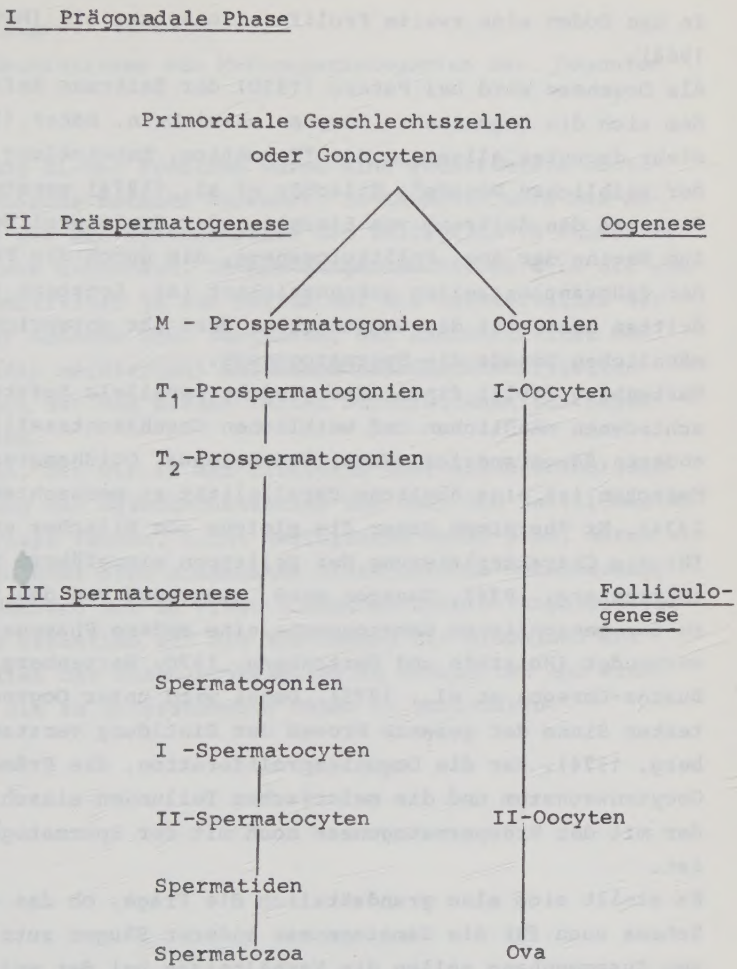



Abb. 1: Schema und Terminologie der Gametogenese (nach Hilscher et al., 1974)

in den Hoden eine zweite Proliferationsphase ein (Novi et al., 1968).
Als Oogenese wird bei Peters (1970) der Zeitraum definiert, in dem sich die Oogonien zu Oocyten entwickeln. Baker (1972) versteht darunter allgemein die "Formation, Entwicklung und Reifung der weiblichen Gonade". Hilscher et al. (1974) verstehen unter Oogenese den Zeitraum vom Einsetzen der Gonienproliferation bis zum Beginn der sog. Follikulogenese, die durch die Proliferation der Prägranulosazellen gekennzeichnet ist. Letztere stellt den dritten Abschnitt der Gametogenese dar; ihr entspricht bei der männlichen Gonade die Spermatogenese.
Wartenberg (1976) findet das gleiche parallele Auftreten der verschiedenen männlichen und weiblichen Geschlechtszellformen bei anderen Säugerspezies (Maus, Stachelmaus, Goldhamster); auch beim Menschen ist eine ähnliche Parallelität zu beobachten (Wartenberg, 1974). Er übernimmt daher die gleiche von Hilscher et al. (1974) für die Charakterisierung der Zelltypen eingeführte Terminologie (Wartenberg, 1976). Dagegen wird, ausgehend von den Beobachtungen an der menschlichen Gametogenese, eine andere Phaseneinteilung verwendet (Holstein und Wartenberg, 1970; Wartenberg, 1974; Bustos-Obregon et al., 1975). Dabei wird unter Oogenese im weitesten Sinne der gesamte Prozeß der Eibildung verstanden (Wartenberg, 1974), der die Oogonienproliferation, die Prämeiose, das Oocytenwachstum und die meiotischen Teilungen einschließt und weder mit der Präspermatogenese noch mit der Spermatogenese identisch ist.
Es stellt sich also grundsätzlich die Frage, ob das oben skizzierte Schema auch für die Gametogenese anderer Säuger zutrifft. In diesem Zusammenhang sollen die Verhältnisse bei der weißen Maus ausführlich untersucht werden, wobei uns in erster Linie verschiedene Fragen zur Gonienproliferation interessieren und im Folgenden untersucht werden sollen:

1) Verlaufen die Phasen der mitotischen Aktivität bei beiden Geschlechtern der Maus ebenfalls zeitlich streng parallel?
2) Erfolgen die Teilungen der Gonien bei beiden Geschlechtern

gleich häufig?
3) Wieviele Generationen von M-Prospermatogonien bzw. Oogonien gibt es?

Zur Bearbeitung dieser Probleme wurde eine quantitative histoautoradiographische Methode verwandt. 3H-Thymidin wird bei Angebot während der DNA-Synthesephase des Zellzyklus (S-Phase) in die Kernsubstanz eingebaut. In der folgenden Mitose wird die eingebaute Radioaktivität je zur Hälfte auf die Tochterzellen verteilt. Aus der Abnahme bzw. Verdünnung der Radioaktivität der (mit 3H-Thymidin markierten) Zellkerne der Geschlechtszellen sollte die Zahl der von diesen Zellen durchlaufenen Teilungen bestimmt werden.
Da die Angaben, die wir in der Literatur über die cytologische Differenzierung der Geschlechtszellen und über den zeitlichen Ablauf dieser Phase fanden, nicht ausreichend genau sind, waren wir gezwungen, zunächst eine eingehende histologische Untersuchung der Gonaden während der in Frage kommenden Entwicklungszeit vorzunehmen, die Kriterien für die Bestimmung der einzelnen Entwicklungsstadien der Geschlechtszellen zu erarbeiten und einen Zeitplan für die zu untersuchende Phase zu skizzieren.

## II. Material und Methode

1. Durchführung der Tierversuche und histologische Präparation der Organe.

Die Untersuchungen wurden an Feten von weißen NMRI-Mäusen durchgeführt. Je zwei Weibchen (30 - 40 g Körpergewicht) kamen mit einem Bock des gleichen Stammes für eine Nacht zur Paarung in einen Käfig. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen mit Vaginalpfropf abgesondert. Der Vaginalpfropf wurde als Zeichen einer erfolgten Befruchtung und eines möglichen Schwangerschaftsbeginns gewertet. Dieser Tag wird als 1. Tag post conceptionem (p.c.) der Entwicklung bezeichnet. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum (24 $^{o}$C bei 70 % Luftfeuchtigkeit) gehalten und erhielten Standardnahrung und Wasser ad lib.

Für eine histologische Untersuchung zur Vororientierung wurden 6 weibliche Tiere, 2 am 12. Tag p.c. 20 Uhr, je 1 am 13., 14., 15. und 16. Tag p.c., 8 Uhr getötet. Insgesamt wurden die Gonaden von 18 Embryonen untersucht.

Im eigentlichen Versuch wurde 24 weiblichen Tieren 7 µ Ci 3H-Thymidin (Thymidin [Methyl-3H] , Sp A 6,7 Ci/mmol, NET 0,27, NEN Chemicals GmbH Dreieichenhain) pro g Körpergewicht appliziert und sie wurden in gestaffelten Intervallen nach Applikation getötet. Zahl der behandelten Tiere, Zeitpunkt der Thymidin-Injektion und Dauer des Intervalls bis zur Tötung sind der Abb. 2 zu entnehmen. Insgesamt wurden die Gonaden von 104 Embryonen untersucht.

Nach Untersuchungen von Samuels und Kisielski (1963) am Samenepithel der Maus führen 1 µCi 3H-TdR/g Körpergewicht auch sieben Tage nach Applikation zu keinen Schäden.

In unserem Versuch wurden 7 µCi/g Körpergewicht in einer niedrigen spezifischen Aktivität (6,7 Ci/mmol) appliziert. Bei Berücksichtigung der Plazentarschranke (Wegener, Hollweg und Maurer, 1964) dürfte die Dosierung unter 1 µCi/g Fet liegen. Bei Tieren mit einer Markierungsdauer von 3 Tagen fanden wir keinen morphologischen Hinweis für Strahlenschäden.

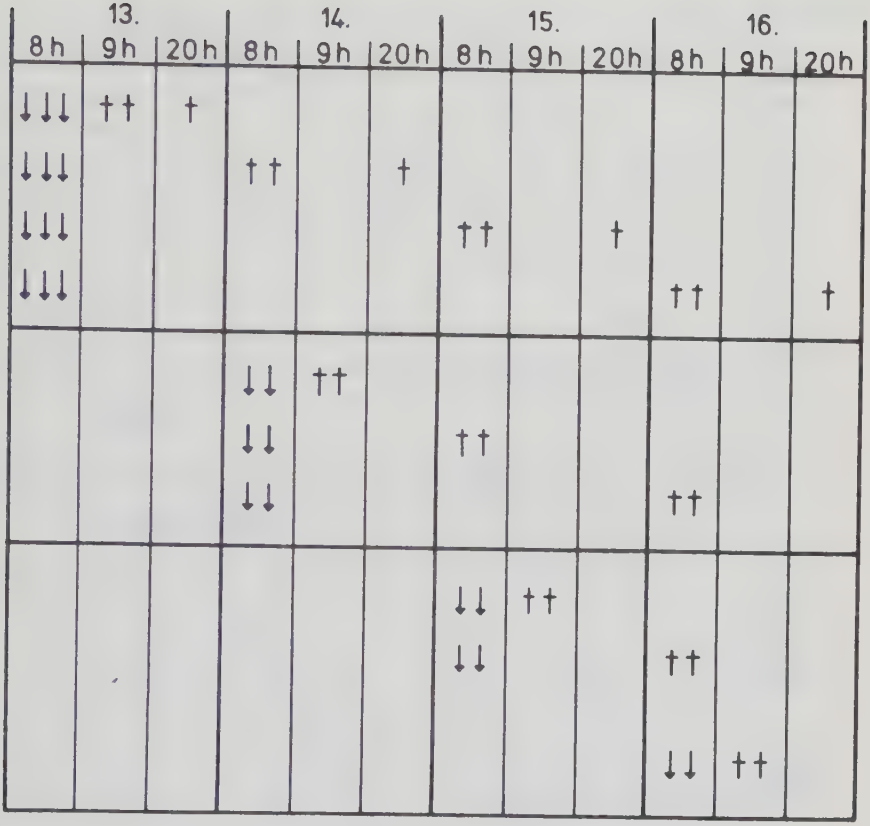
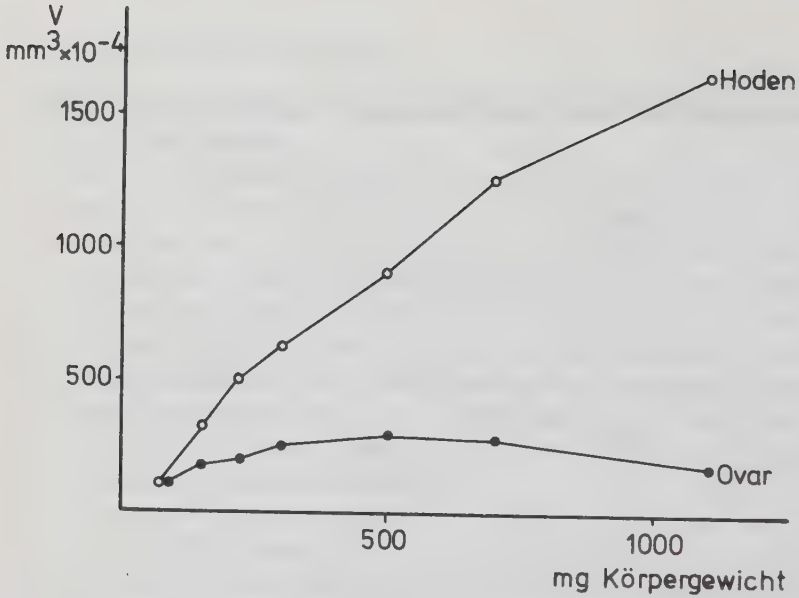



Abb. 2: Schema der Versuchsanordnung.

↓ bedeutet Applikation von 3H-Thymidin, + bedeutet Tötung des Tieres. Jedes Zeichenpaar ( ↓ ... +) entspricht einem Muttertier; der Abstand der beiden Zeichen voneinander gibt die Markierungsdauer des untersuchten Tieres wieder. Die Zahl der Zeichenpaare entspricht der Zahl der untersuchten Tiere.
Der Zeitpunkt der Applikation von 3H-TdR und die Markierungsdauer werden im weiteren in folgender Weise abgekürzt: Markierung eines Tieres am 13. Tag p.c. und Tötung nach 60 Minuten. Markierungsdauer wird als "Termin 13/13" bezeichnet; die Markierung am 13. Tag p.c., 8 Uhr und Tötung am 14. Tag p.c., 8 Uhr werden als "Termin 13/14" abgekürzt usw.



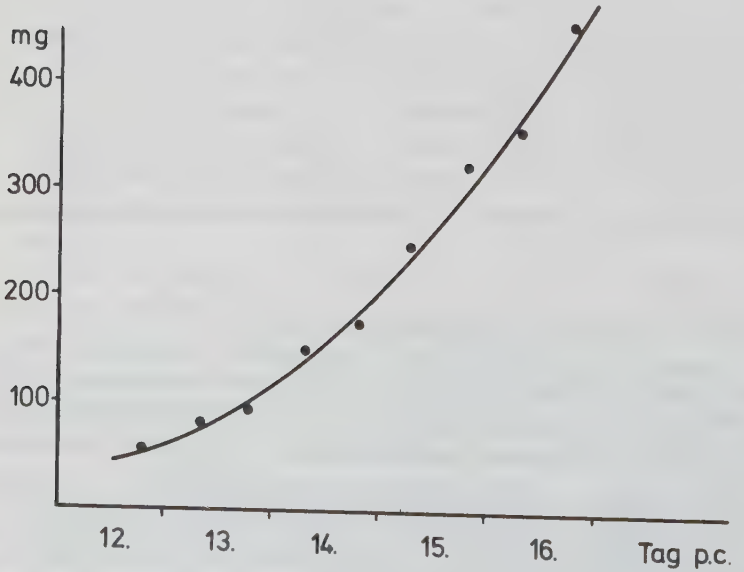




Abb. 3: a) Beziehung zwischen der Entwicklung des Gonadenvolumens und der des Körpergewichtes bei Feten der Swiss-Maus (nach Jean, 1971).

b) Mittlere Körpergewichte der von uns untersuchten Feten.

Fixierung und Einbettung. Alle Tiere wurden durch Decapitation getötet; die Feten wurden sofort entnommen, auf einer Analysenwaage gewogen und mit eröffneter Bauchhöhle 3 Stunden in Davidson-Lösung (3 T Äthanol 96 %, 2 T Formol 40 %, 1 T Eisessig, 3 T Auqa dest.) vorfixiert. Anschließend wurden die Gonaden unter der Lupe präpariert und - wenn möglich - das Geschlecht bestimmt. Danach wurden die Präparate weiter bis insgesamt 60 Stunden fixiert. Zusätzlich wurden von den Muttertieren die Ohren entnommen und in gleicher Weise wie die fetalen Organe fixiert und histologisch verarbeitet.
Die Gewebsstücke wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe sieben Stunden lang dehydriert und über Methylbenzoat und Benzol in Paraplast eingebettet.

Auswahl der zu untersuchenden Feten. Um eine vergleichende Untersuchung durchführen zu können, müssen Tiere benutzt werden, die etwa das gleiche Alter haben, bzw. sich im gleichen Entwicklungsstadium befinden. Der Termin der Konzeption allein kann um mindestens 12 Stunden schwanken; auch die Feten eines Muttertieres befinden sich nie exakt im gleichen Entwicklungsstadium. Jean (1971) stellte eine feste Beziehung zwischen der Zunahme des Körpergewichtes und dem Gonadenvolumen bei Embryonen von Swiss-Mäusen fest. Bei einer orientierenden Durchsicht der histologischen Bilder der Gonaden von Tieren unterschiedlichen Körpergewichts konnten wir ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Entwicklungsstand feststellen.
Basierend auf diesem Ergebnis suchten wir für die autoradiographischen Untersuchungen Feten mit dem für den entsprechenden Termin mittleren Körpergewicht aus (Abb. 3).
Eine zusätzliche Bestimmung des Gonadenvolumens wäre exakter gewesen, wir verzichteten jedoch wegen des Aufwands der Methode darauf.

Herstellung der Schnitte. Da eine möglichst gleichmäßige Schnittdicke für die quantitative Autoradiographie unerläßlich ist, wurden die Schnitte auf einem Kryotom (Minot-International) bei konstanter Temperatur von 15°C ± 2°C angefertigt. Die Schnittdicke betrug 6 µ.
Die Organe wurden in Serie geschnitten. Von jeder Serie wurden im Wechsel 3 Schnitte zur Autoradiographie, die folgenden 3 Schnitte für die histologische Untersuchung auf Objektträger aufgezogen.
Die Vergleichsmöglichkeit eines Autoradiogramms mit einem histologisch einwandfrei beurteilbaren Nachbarschnitt schien uns aus folgenden Gründen notwendig:
Der Strippingfilm und die Silberkörner über dem Schnitt eines Autoradiogramms beeinträchtigen die Qualität des histologischen Bildes und erschweren erheblich die eindeutige Differenzierung der einzelnen Zellarten. Wegen der beabsichtigten quantitativen Auswertung der Autoradiogramme wollten wir jedoch auf eine Vorfärbung der zur Autoradiographie vorgesehenen Schnitte verzichten. Daher hatten wir nicht die Möglichkeit, eine Vergleichsfotografie am gleichen, zunächst unbefilmten aber vorgefärbten Schnitt anzufertigen.
Auch die bei einem Teil der Autoradiogramme verwandte Feulgen-Reaktion konnte aufgrund des bei dieser Reaktion auftretenden erheblichen und unterschiedlichen - also nicht kontrollierbaren - Verlustes an Radioaktivität der Schnitte nicht vor der autoradiographischen Exposition durchgeführt werden (Lang et al., 1965).

2. Autoradiographische Technik

Die zur Autoradiographie vorgesehenen Schnitte wurden in einem Xylolbad sorgfältig entparaffiniert,durch eine absteigende Alkoholreihe geführt und 30 Minuten fließend in Aqua dest. gewässert. Die Objektträger wurden anschließend mit Chromalaungelatine (5 g Gelatine bei 37°C in 1000 ml Aqua dest. gelöst und nach dem Abkühlen 0,5 g Chromalaun zugefügt) zur besseren Haftung des Strippingfilms auf dem Objektträger beschichtet (Amlacher, 1974).

Exposition. Die Objektträger wurden bei gelbem Safe-Light mit Strippingfilm (Kodak AR 10) überzogen und die Präparate anschließend 12 Stunden bei 20°C, einer Luftfeuchtigkeit von 50 % und bei absoluter Dunkelheit getrocknet.
Nach Trocknung wurden die Präparate in schwarze Präparate-Kästen aus Plastik (Clay-Adams-Box) gepackt und bei -10°C 20 Tage lang exponiert. Die Boxen enthielten zur Vermeidung eines Fading-Effektes $CaSO_4$ als Trockenmittel.
Anm.: Unter Fading-Effekt versteht man das Schwinden von Silberkörnern während der Exposition. Er ist bedingt durch die Oxydation von Silber und tritt vor allem bei zu hoher Feuchtigkeit, bei Temperaturanstieg und bei zu hohem $O_2$-Gehalt des Präparates auf (Amlacher, 1974). Ob auch bei Verwendung des Kodak-AR 10-Strippingfilms Fading-Erscheinungen auftreten können, ist bisher umstritten (Pelc, 1956 und Schultze, 1968).

Entwicklung. Die Filme wurden bei Safe-Light 3 Minuten entwikkelt (Kodak D-19 Negativ-Entwickler), die Entwicklung in Aqua dest. gestoppt, 10 Minuten fixiert und 30 Minuten gewässert. Anschließend wurden die Präparate vor jeder weiteren Verarbeitung mindestens 48 Stunden aufrecht stehend und staubfrei getrocknet.

Kontrolle der autoradiographischen Arbeit. Da in jeder Phase des autoradiographischen Arbeitens Unterschiede in der Behandlung der Präparate bzw. Fehler einen Einfluß auf die Silberkorndichte über den Zellen haben, ließen wir stets Kontrollautoradiogramme mitlaufen: Wir fertigten von einem Methylmetacrylate-Block ( [3H] Methylmetacrylate, Radioaktivität: 50 µCi/g polymer, Amersham) auf einem Ultramikrotom Schnitte an, die 1, 2, 3 und 4 µ dick waren. Objektträger mit solch einem Satz von Schnitten begleiteten die Versuchspräparate in allen Arbeitsphasen. Bei stets gleicher Behandlung sollte auch die Silberkorndichte (SKD)/Flächeneinheit über den Kontrollpräparaten gleich bleiben. Der so registrierte Fehler war sehr gering und konnte vernachlässigt werden. Lediglich 12 Autoradiogramme wurden wegen stärkerer Abweichungen der SKD (Silberkornzahl / Fläche) in ihren Kontrollautoradio-

grammen bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

3. Färbungen

Die Präparate für die histologische Untersuchung wurden nach Entparaffinieren mit Hämalaun gefärbt.
Die Autoradiogramme wurden mit Hämalaun oder nach Feulgen gefärbt.
Hämalaun-Färbung (Abb. 4a): Die luftgetrockneten Autoradiogramme werden 30 Minuten mit Hämalaun gefärbt, 30 Minuten vorsichtig durch Wässern gebläut und erneut 24 Stunden luftgetrocknet. Um die Farbe aus der Gelatine des Strippingfilms zu entfernen, wurden die trockenen Präparate mit HCl-Alkohol differenziert.
Feulgen-Reaktion (Abb. 4b): Da die Gelatine des Strippingfilms durch die Säure-Hydrolyse angegriffen und die Silberkörner verlagert werden, muß die Gelatine durch eine Fixierung in Formalin geschützt werden. Das von Deimling et al. (1968) für Flüßigemulsionen angegebene Verfahren mußte modifiziert werden, da der Strippingfilm nicht so fest auf dem Objektträger haftet. Außerdem besteht der Film aus mehreren Schichten, zwischen denen bei Fixierung und Hydrolyse Spannungen auftreten können. Die gut getrockneten Präparate werden wie folgt behandelt: Fixierung der Gelatine durch Einstellen in 5 %iges Formalin für 12 Stunden und anschliessend in 10 %iges Formalin für 24 Stunden; 1 Stunde vorsichtig wässern; 24 Stunden lufttrocknen. An diese Vorbehandlung schließen wir eine Feulgen-Reaktion mit Langzeithydrolyse (Böhm, 1968; Böhm et al., 1968; Sandritter et al., 1965) an: 5 Stunden Hydrolyse in 2N HCl bei 28°C in einem genau eingestellten Wärmeschrank; 1 Stunde Behandlung mit Schiff'schem Reagenz (Graumann, 1953) bei Zimmertemperatur und in Dunkelheit; Auswaschen in 1 %igem $SO_2$-Wasser 3x10 Minuten; Auswaschen in fließendem Wasser 30 Minuten und anschließend lufttrocknen.

Einfluß der Formalinfixierung und der Hydrolyse auf die SKD:
Die oben beschriebenen Kontrollautoradiogramme wurden in ungefärbtem Zustand photometrisch ausgemessen. Anschließend wurden die Präparate wie oben beschrieben in Formalin fixiert und mit der

Langzeithydrolyse behandelt. Erneutes Ausmessen der Präparate zeigte, daß die SKD/Fläche unverändert geblieben war. Die oben beschriebene Methode ist also für die quantitative Autoradiographie brauchbar. Die Auswertung dieser Autoradiogramme wird dadurch erleichtert, daß keine störende Anfärbung der Gelatine auftritt, andererseits die fehlende Anfärbung des Cytoplasmas die Orientierung im histologischen Bild des Autoradiogramms verbessert (Abb. 4a, b).

Etwa ein Drittel unserer Präparate wurde mit der Feulgen-Reaktion behandelt. Es war anfangs beabsichtigt, neben der Silberkorndichte über dem Kern einer Geschlechtszelle auch die Kernfläche durch automatisches Scannen mit einem Mikroskop-Photometer zu bestimmen. Aus verschiedenen Gründen ließ sich das Verfahren nicht durchführen.

Alle Autoradiogramme wurden nach der Färbung nicht eingedeckt, sondern lediglich staubfrei aufbewahrt.

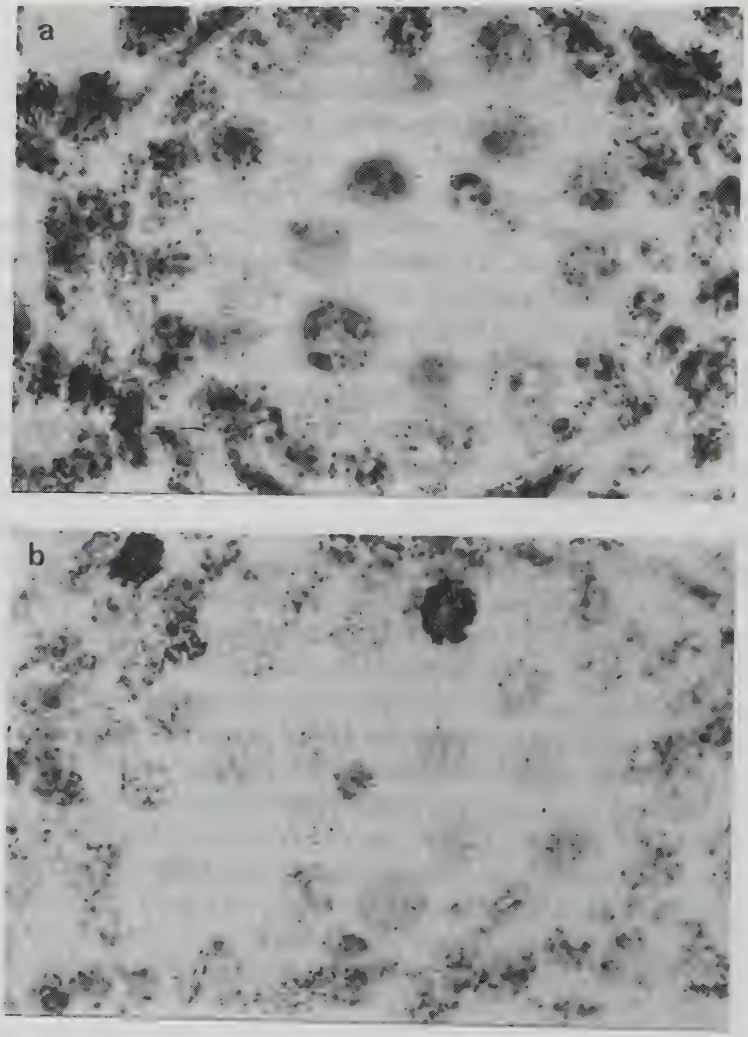



Abb. 4: Histoautoradiogramme eines quergeschnittenen Keimstranges eines fetalen Hodens am 15. Tag p.c. Vergr.: 1250 x

a) Nach Färbung des Autoradiogramms mit Hämalaun
b) Autoradiogramm nach Durchführung der Feulgen-Reaktion

## 4. Auswertung der Autoradiogramme

An den Autoradiogrammen der Termine (Termin = Markierung/Tötung) 13/13, 14/14, 15/15 und 16/16 wurden die Markierungsindices bestimmt: Dabei handelt es sich um den Prozentanteil der markierten Zellkerne an der Gesamtzahl aller Zellkerne von Geschlechtszellen.
An Schnitten vom 12. Tag p.c., 20 Uhr bis zum 16. Tag p.c., 20 Uhr, wurde der Mitoseindex bestimmt: Dabei wird der Anteil der sich in Mitose befindlichen Geschlechtszellen an der Gesamtzahl aller Geschlechtszellen ermittelt.
Photometrische Auswertung. Die Bestimmung der Silberkorndichte (SKZ/Fläche) mit dem Auflicht-Mikroskop-Photometer ersetzt das mühsame Verfahren des Auszählens der Silberkörner/Flächeneinheit. Die Messung erfolgt durch photoelektrische Registrierung des Lichtes, das bei vertikaler Auflichtbeleuchtung (Auflicht-Hellfeld) von den einzelnen Silberkörnern reflektiert bzw. remittiert wird (Rogers, 1961; Dörmer et al., 1966; Dörmer, 1967). Die Messung wurde mit einem Leitz-Photometer MPV durchgeführt, das an ein Zeiss-Photomikroskop adaptiert war. Die auszumessenden Zellkerne wurden unter Sicht im Einblickfernrohr des Photometeraufsatzes in die Meßblende (variable Irisblende, konstanter Durchmesser 10 µ) eingestellt, die Beleuchtung von Durchlicht auf Auflicht umgeschaltet und durch Öffnen der Photokathode die remittierte Lichtmenge gemessen. Der dem remittierten Strahlenfluß proportionale Meßstrom wurde über einen Vitatron-Schreiber in willkürlichen Einheiten aufgetragen. Um Spannungsschwankungen zu vermeiden, war der gesamten Apparatur zusätzlich ein Spannungskonstanthalter vorgeschaltet. Gemessen wurde bei 400facher Vergrößerung (Zeiss-HD-Objektiv 100/oel); Interferenzverlaufsfilter: 436nm; Saugspannung: 1,2 KV.

Fehlerkorrektur der photometrischen Auswertung:
1) Zu Beginn jeder Messung und folgend in regelmäßigen Zeitabständen (in der Regel einmal pro Stunde) wurde ein und derselbe Zellkern ausgemessen, um Schwankungen der Apparatur (Schwächer-

werden der Lampe etc.) zu erfassen und die Ursachen zu beseitigen.
2) Bei der Färbung von Strippingfilm-Autoradiogrammen mit Hämalaun färbt sich die Stützgelatine unterschiedlich an. Da bei der Auflichtphotometrie der auszumessende Lichtstrahl diese Schicht zweimal durchlaufen muß, kann es bei unterschiedlicher Anfärbung der Gelatine zu verschieden starker Lichtabsorption kommen.
Den Zusammenhang zwischen Lichtabsorption der gefärbten Gelatine, gemessen im Durchlicht, und der Lichtremission bei gleichbleibender SKD, gemessen im Auflicht, erfaßten wir folgendermaßen:
An ungefärbten Kontrollautoradiogrammen (s.o.) wurde photometrisch die **Silberkorndichte** bestimmt. Dann wurden die Kontrollautoradiogramme unterschiedlich stark mit Mayer's Hämalaun angefärbt und anschließend erneut ausgemessen:

a) die **SKZ/Fläche** im Auflicht, b) die Lichtabsorption der gefärbten Stützgelatine im Durchlicht neben den Schnitten.
Die Meßwerte wurden in Extinktionen umgerechnet ($E = \log \frac{Io}{I}$; Io = 100 %, also Remission und Transmission vor der Färbung; I = Remission bzw. Transmission in %, gemessen nach der Färbung).
Wie Abb. 5 zeigt, besteht zwischen den Extinktionen im Auflicht und denen im Durchlicht eine lineare Beziehung. Die Auflicht-Extinktionen liegen in unseren Präparaten um den Faktor 1.8 höher als die Durchlicht-Extinktionen.
In den Gonadenpräparaten wurde die Durchlichtabsorption der Stützgelatine neben den ausgemessenen Schnitten gemessen. Die aus dem Meßwert errechnete Durchlichtextinktion wurde mit dem Faktor (s.o.) 1.8 multipliziert und so die Auflichtextinktion erhalten; aus der Auflichtextinktion kann der Wert $\frac{Io}{I}$ errechnet werden, der für die Meßreihe des entsprechenden Schnittes den Korrekturfaktor darstellt. Die Korrekturwerte schwankten zwischen 1,2 und 1,5, lagen aber in der Mehrzahl der Fälle eng beieinander.
Ähnliche Untersuchungen und Korrekturverfahren wurden von Dörmer (1967) durchgeführt.

Photometrische Auswertung der Versuchspräparate.
Pro Termin (= Markierung / Tötung) und Geschlecht wurden die

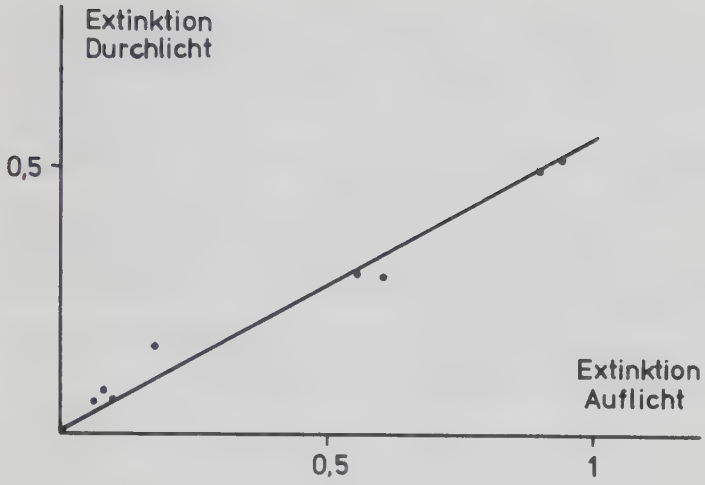



Abb. 5: Einfluß des Farbstoffgehaltes der Strippingfilm-gelatine von mit Hämalaun gefärbten Autoradiogrammen auf den Meßwert der Silberkorndichte.

Gonaden von durchschnittlich drei Embryonen photometrisch ausgewertet. Es wurden von den Serienschnitten jeder 6. Schnitt und pro Tier etwa 100 Zellen ausgewertet. Es wurden nur voll angeschnittene, d.h. möglichst die größten Kernanschnitte ausgemessen.

In der gleichen Weise wurden die markierten Epithelzellen des Ohrepithels der Muttertiere und Knorpelzellen der Feten ausgemessen. Beide Zellarten haben eine vergleichsweise lange Generationszeit. Daher kann bei Vergleich der mittleren SKD/Kern der Ohrepithelien die unterschiedliche Aufnahme und Verwertung von 3H-Thymidin durch die einzelnen Muttertiere erfaßt werden. Anhand der SKD/Kern der Knorpelzellen wurden Unterschiede des 3H-Thymidineinbaus zwischen den Feten eines Muttertieres abgeschätzt. Die Meßreihen der SKD/Kern der Gonaden wurden im Verhältnis der so erfaßten Differenzen korrigiert.
Die Methode der graphischen Auswertung der Meßergebnisse wird bei der Beschreibung der Befunde S. 35 erläutert.

## III. Ergebnisse

### 1. Histologische Befunde über die Entwicklung der Gonaden vom 12. Tag p.c., 20 Uhr bis zum 16. Tag p.c., 20 Uhr.

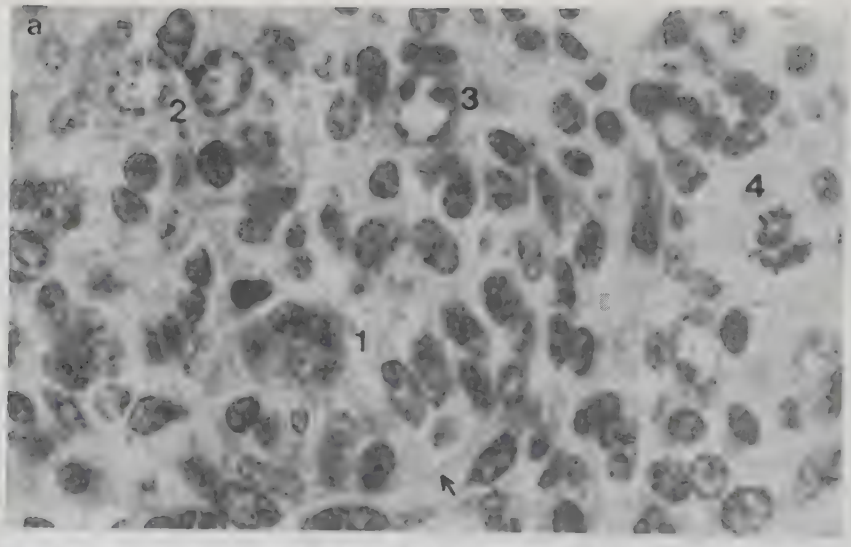
Die Mehrzahl aller untersuchten Gonaden vom 12. Tag p.c., 20 Uhr läßt noch keine Geschlechtsdifferenzierung erkennen. Die Gonade ist ein zellreiches Organ. Eine Tunica albuginea und die Ausbildung von Keimsträngen fehlen; die freie Oberfläche zur Bauchhöhle ist von einem einreihigen, sich intensiver anfärbenden Epithel bedeckt.
Das Organ besteht im wesentlichen aus drei verschiedenen Zelltypen: Die Gonocyten haben einen großen, runden bis ovalen Kern mit dichtem Chromatin und 2 - 3 Nucleolen.
Wesentlich seltener sind die Gonien: Sie imponieren als große, blasse Zellen und heben sich deutlich von der dichten und intensiver angefärbten Umgebung ab. Meist liegen sie einzeln oder als "Paar". Der Zellkern ist etwa doppelt so groß wie der der Gonocyten. Das Chromatingerüst ist nicht so dicht und die Kernmembran unscharf gezeichnet. Die Kerne enthalten 2 - 4 Nucleolen. Vereinzelt finden sich auch Gonien in mitotischer Prophase, die bei der von uns verwandten Fixierung ein typisches Bild zeigen: Das Chromatin ist in groben Schollen "krustenförmig" der Kernmembran angelagert (Hilscher et al., 1974). Die Kerne des dritten Zelltyps, der somatischen Zellen, sind von wechselnder Gestalt und unterschiedlich angefärbt. Meist sind sie länglich und besitzen eine dichte Kernmembran.
Am 13. Tag p.c. ist in vielen Organen eine Differenzierung zum Hoden zu erkennen: Die Zellen sind gruppenförmig angeordnet. Diese Keimstränge werden von einer Basalmembran umgeben, die andeutungsweise zu erkennen ist; ein Zwischengewebe ist noch nicht vorhanden. Die zu diesem Zeitpunkt noch "undifferenzierten" Gonaden dürfen als Ovarien betrachtet werden.
Unter den Zellen der Gonaden werden die Gonien zahlreicher; in den Ovarien die Oogonien, in den Hoden die M-Prospermatogonien.

Die Entwicklung des Hodens ab dem 14. Tag p.c. ist dadurch ausgezeichnet, daß die Keimstränge auseinanderrücken und von einem lockeren Zwischengewebe getrennt sind. Die M-Prospermatogonien zeigen eine lebhafte, synchronisierte Proliferation, was zur Ausbildung von Zell"nestern" führt. Ab dem 15. Tag p.c. findet sich in den Keimsträngen eine zunehmende Ordnung der Zellen: M-Prospermatogonien liegen im Innern der Keimstränge, während die somatischen Zellen, die Stützzellen, sich an der Basalmembran aufreihen. M-Prospermatogonien und T1-Prospermatogonien sind schwer voneinander zu unterscheiden: Die Kerne der T1-Prospermatogonien sind kleiner, kreisrund und ihr Chromatin ist homogener verteilt.
Am 16. Tag p.c. enthalten die Keimstränge nur noch zentral gelegene T1-Prospermatogonien und an der Basalmembran aufgereihte Stützzellen. Die T1-Prospermatogonien sind größer geworden und haben um die meist zwei Nucleolen einen typischen Hof (Hilscher, 1974).

In den Präparaten des Ovars sind am 14. Tag p.c. Gruppen von Oogonien - wie die M-Prospermatogonien im Hoden - in Mitose zu sehen, sehr viele im oben beschriebenen Prophasestadium. Am 14. Tag p.c., 20 Uhr befinden sich schon einige Zellnester im Stadium der meiotischen Prophase, die an den beiden folgenden Tagen in rascher Folge durchlaufen wird. Die einzelnen Abschnitte der meiotischen Prophase wurden nach folgenden Kriterien differenziert:

- Postmitotische Oocyten: Es handelt sich um Zellen mit kleinen Kernen, die durch die "krustenförmige" Anordnung ihres Chromatins der Oogonien-Prophase ähneln.
- Leptotän: Die Kerne sind rund, das Chromosomenmaterial ist feinfädig aufgelockert, "wollartig"; die Nucleolen verschwinden.
- Zygotän: Die Chromosomenstruktur des Kerns ist gröber, es kommen Bouquet-ähnliche Strukturen vor.

- Pachytän: Die Chromosomen sind in dicken Fäden angeordnet.
- Dipolotän: Zellen dieses Stadiums sind selten und nur am 16. Tag p.c., 20 Uhr zu sehen; die Chromosomenfäden sind dünner geworden, die Zelle nimmt stark an Größe zu.
Gleichzeitig wird zunehmend ein Kranz von Zellkernen von Prägranulosazellen sichtbar.



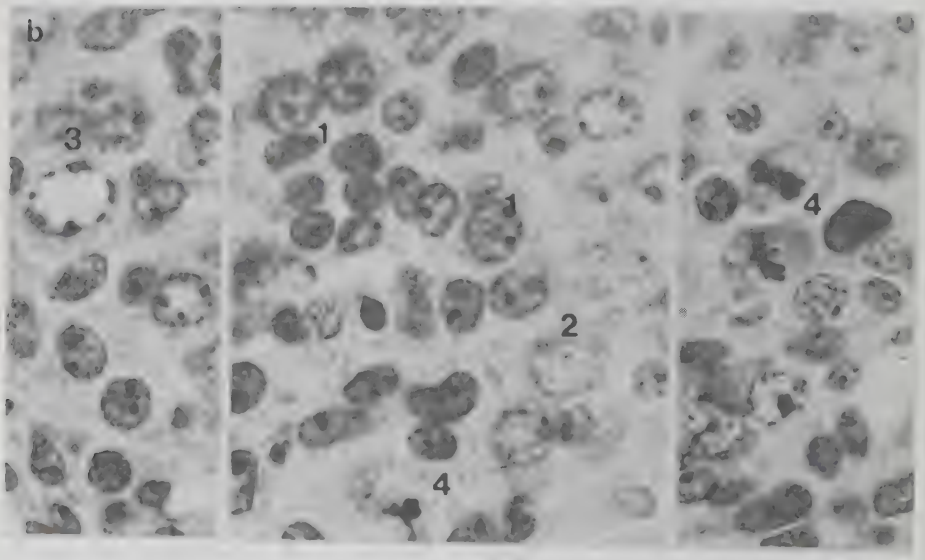




Abb. 6: Mikroskopische Aufnahmen zur Entwicklung der Gonaden vom 13. bis 16. Tag p.c. Hämalaun-Färbung. Vergr.: 1250 x

a) Hoden am 13. Tag p.c.: Anschnitte mehrerer Keimstränge, von Basalmembranen (Pfeil) umgeben; 1 männlicher Gonocyt; 2 M-Prospermatogonien in Interphase, 3 in Prophase, 4 in Metaphase.

b) Ausschnitte vom Ovar am 13. Tag p.c.: 1 weibliche Gonocyten, 2 Oogonien in Interphase, 3 in Prophase, 4 in Metaphase.

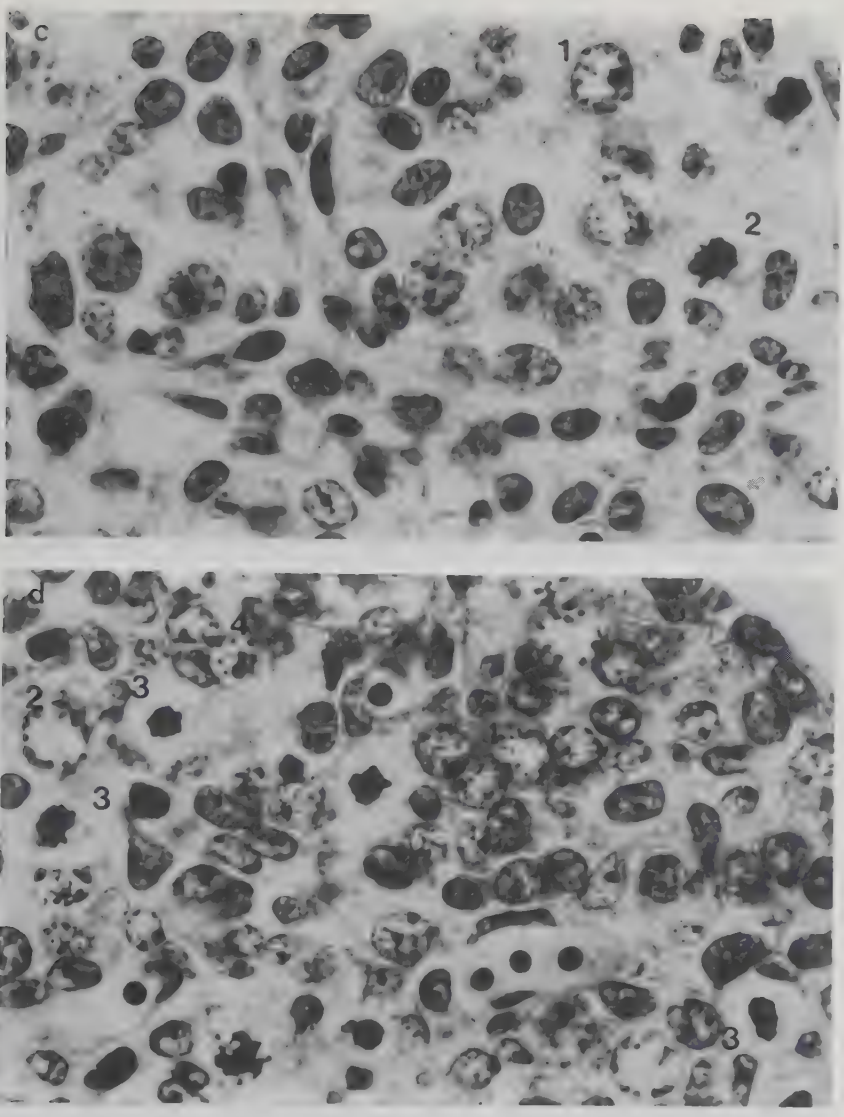



Abb. 6:

c) Hoden am 14. Tag p.c.: 1 M-Prospermatogonien in Interphase, 2 in Metaphase.

d) Ovar am 14. Tag p.c.: 1 Oogonien in Interphase, 2 in Prophase, 3 in Metaphase; 4 postmitotische Oocyten.

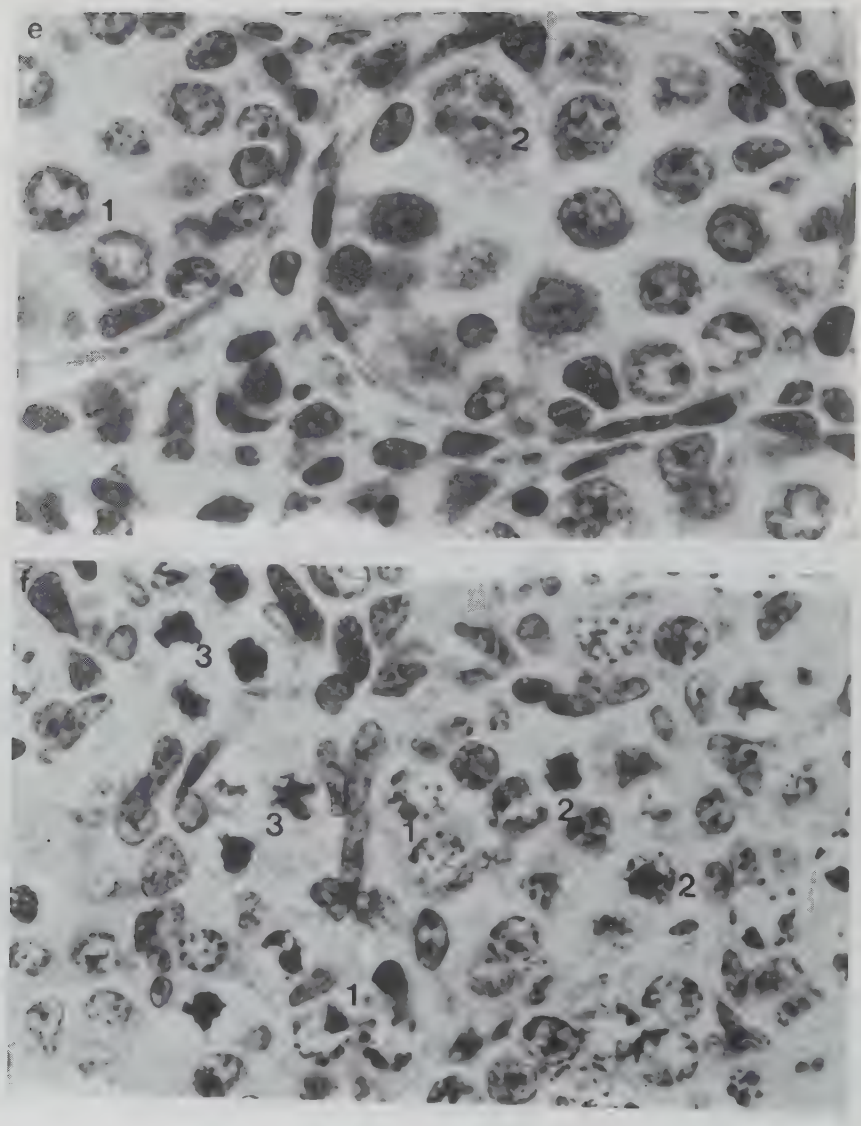



Abb. 6:

e) Hoden am 15. Tag p.c.: 1 zwei M-Prospermatogonien in Interphase; 2 $T_1$-Prospermatogonien.

f) Ovar am 15. Tag p.c.: 1 postmitotische Oocyten; 2 Oocyten im Leptotän; 3 Oocyten im Zygotän.

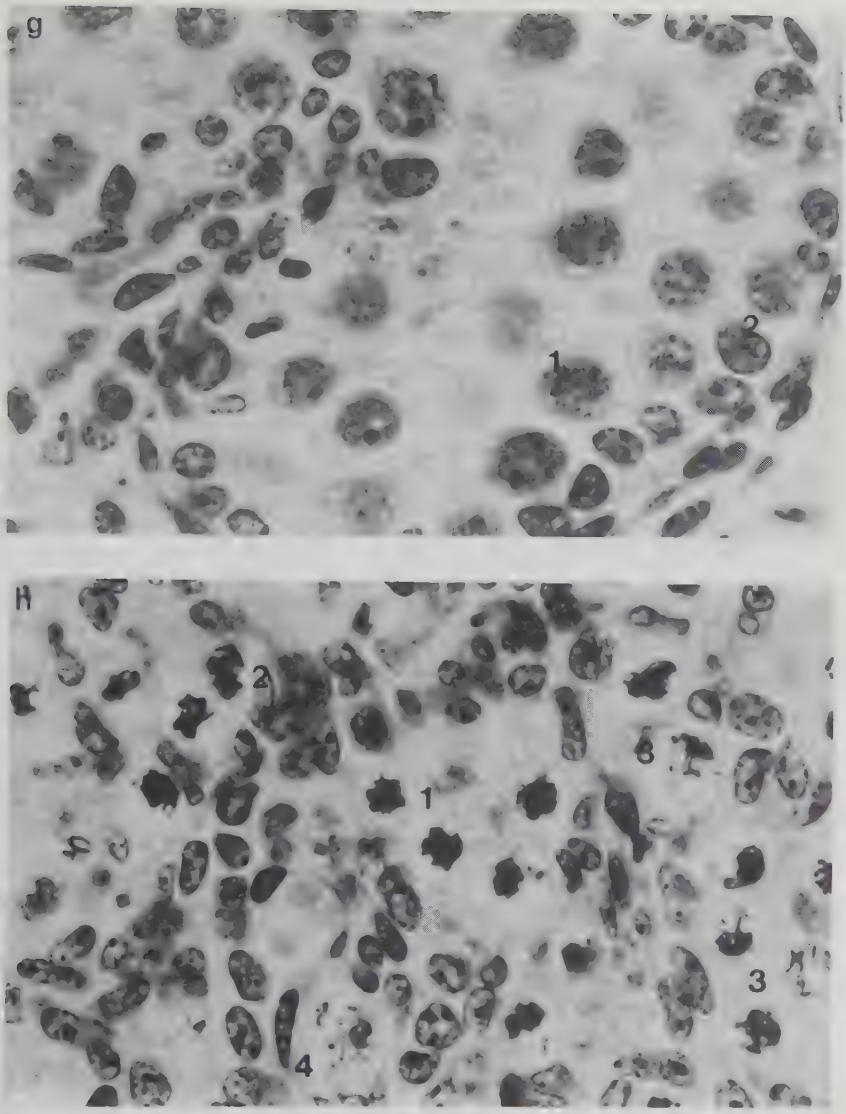



Abb. 6:

g) Hoden am 16. Tag p.c.: 1 $T_1$-Prospermatogonien; 2 Stützzellen.

h) Ovar am 16. Tag p.c.: 1 Oocyten im Zygotän; 2 Oocyten im frühen Pachytän; 3 Oocyten im Pachytän; 4 eine Oocyte im Diplotän.

2. Ergebnisse der Quantitativ-Histologischen Untersuchungen

In Abb. 7a sind die Werte der Mitoseindices (MI) aufgetragen. Sie verhalten sich bei männlichen und weiblichen Gonaden an allen Terminen gleich: Vom 12. Tag p.c., 20 Uhr bis zum 14. Tag p.c. liegt der MI im Mittel bei 48,6 ‰ , am 15. Tag p.c. bei 20 ‰ und am 15. Tag p.c., 20 Uhr beträgt er fast 0 ‰. Das bedeutet, daß Oogonien und M-Prospermatogonien sich vorwiegend am 13. und 14. Tag p.c. teilen. Die Proliferationsphase wird schnell und fast ohne Übergang zur folgenden Entwicklungsphase abgeschlossen und ein Überlappen beider Phasen nicht beobachtet.

In Abb. 7b sind die Werte der Markierungsindices (LI, labelling index) vom 13. Tag p.c. bis zum 16. Tag p.c. aufgetragen.
Der Markierungsindex (LI) liegt bei der männlichen und weiblichen Gonade am 13. und 14. Tag p.c. bei 35 - 40 %.
Am 15. Tag p.c. differieren die Markierungsindices stark: Der LI der weiblichen Gonade ist doppelt so hoch wie der der männlichen Gonade. Am 16. Tag p.c. markieren sich bei Injektion von 3H-Thymidin keine Keimzellen mehr. Auch der Verlauf der Kurve der Markierungsindices zeigt, daß die Proliferation von Oogonien und M-Prospermatogonien in gleicher Weise am 13. und 14. Tag p.c. ablaufen. Der Unterschied zwischen männlicher und weiblicher Gonade am 15. Tag p.c. dürfte durch Markierung von Oocyten in der prämeiotischen S-Phase verursacht werden.
Aus der ausführlichen, von Schultze (1968) zusammengestellten Literaturübersicht über die Bestimmungen der Phasen des Zellzyklus sowie den Arbeiten von Wegener et al. (1964) über die Teilphasen des Zellzyklus bei fetalen Zellarten der Ratten läßt sich entnehmen, daß die Mitosedauer recht konstant ist und bei fetalen Zellarten zwischen 0,5 und 0,85 Stunden liegt. Aus dem mittleren Mitoseindex vom 13. und 14. Tag p.c. und einer angenommenen Mitosedauer zwischen 0,5 und 0,85 Stunden kann die Generationszeit (T) aufgrund folgender Beziehungen geschätzt werden:

$$\frac{\text{Dauer der Mitose (M)}}{\text{Dauer der S-Phase (S)}} = \frac{\text{Mitoseindex (MI) \%}}{\text{Markierungsindex (LI) \%}}$$

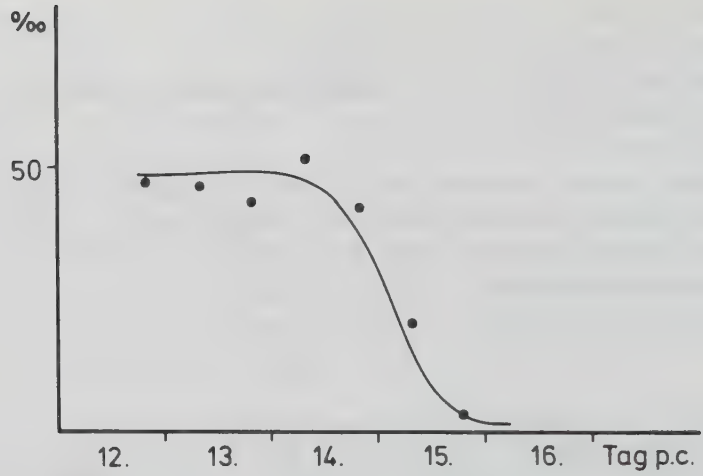
$$\text{Generationszeit (T)} \qquad\qquad 100\ \%$$

Bei "steady state"-Wachstum ist die Zahl der Zellen in einer Phase der Dauer dieser Phase proportional (Lennartz et al., 1964; Wegener et al, 1964; Cleaver, 1967). Aus dieser Beziehung kann die Formel erhalten werden:

$$T = M \cdot \frac{100\ \%}{MI\ \%}$$

Für eine Mitosedauer von 0,5 Stunden ergibt sich daraus eine Generationszeit von 10,4 Stunden und für M = 0,85 Stunden ein T von 17,48 Stunden, der Mittelwert liegt bei rund 14 Stunden. Diese "Berechnung" der Generationszeit stellt keine exakte Bestimmung einer Teilphase des Zellzyklus dar. Sie wurde unter der wohl begründeten Annahme eines Wertes für die Mitosedauer durchgeführt. Es wurde auch nicht berücksichtigt, daß es sich bei Oogonien und M-Prospermatogonien vermutlich um exponentiell wachsende Zellpopulationen handelt. Die Annahme eines exponentiellen Wachstums bei der Berechnung würde eine geringfügige Änderung des Ergebnisses für die Generationszeit bedeuten.

Um eine Übersicht über die vielfältigen und schwer überschaubaren Vorgänge und Entwicklungen innerhalb eines sehr engen Zeitraumes in der weiblichen Gonade zu erhalten, wurde ein Schema über den zeitlichen Ablauf der Oogonienproliferation und die folgende meiotische Prophase erstellt.
Die verschiedenen Zellarten der Oogenese und der meiotischen Prophase wurden anhand der oben beschriebenen cytologischen Kriterien differenziert und ausgezählt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 8 zusammengefaßt: Die primordialen Geschlechtszellen (Gonocyten) werden alle am 13. Tag p.c. innerhalb eines kurzen Zeitraumes zu Oogonien. Die Phase der Oogonienproliferation ist im wesentlichen auf den 13. und 14. Tag p.c. beschränkt. Ebenso



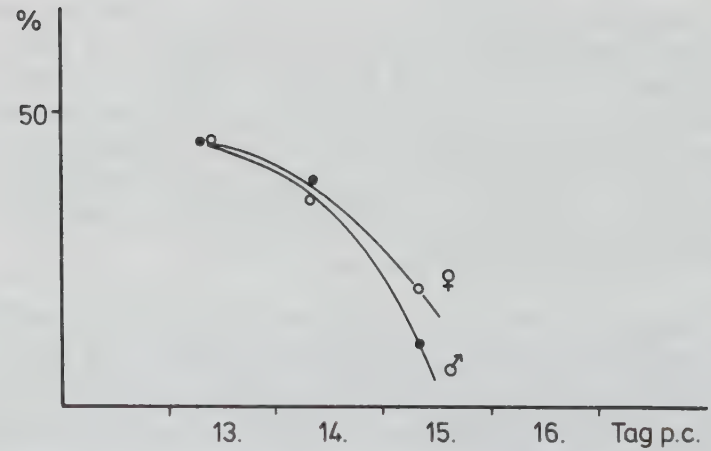
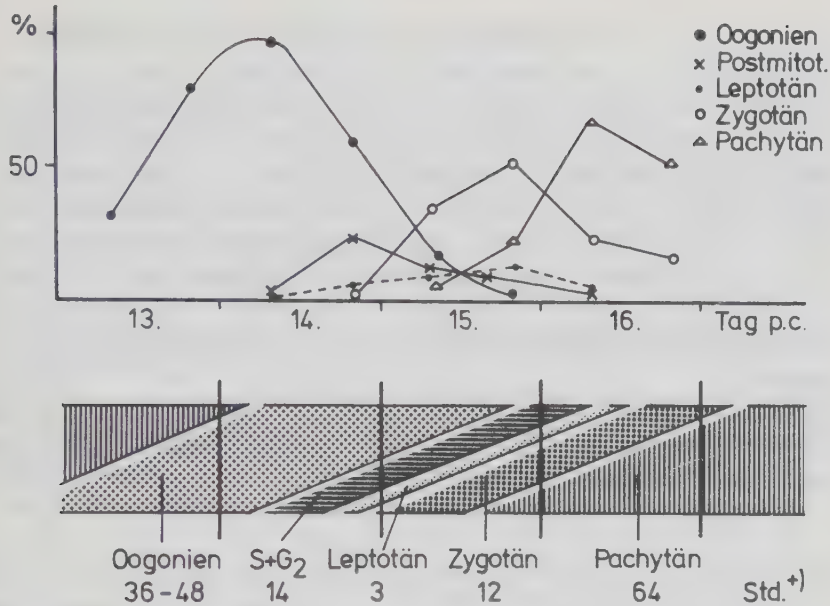




Abb. 7: a) Mitoseindices (MI) der männlichen und weiblichen Geschlechtszellen zwischen dem 12. Tag p.c., 20 Uhr und dem 16. Tag p.c., 20 Uhr. - Der schnelle Abfall des Mitoseindex vom 14. Tag p.c., 20 Uhr bis zum 15. Tag, p.c. entspricht dem Ende der Gonienproliferation bei beiden Geschlechtern.

b) Markierungsindices (MI) der männlichen und weiblichen Geschlechtszellen zwischen dem 13. und dem 16. Tag p.c. - Am 15. Tag p.c. ist der Markierungsindex der weiblichen Keimzellen doppelt so hoch wie der der männlichen. Am 16. Tag p.c. markieren sich keine Keimzellen mehr.




| Tag p.c. | | Gono-cyten | Oogo-nien | Post-mitot. | Lepto-tän | Zygo-tän | Pachy-tän | Diplo-tän | Dege-ner. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 13. | 8h | 71,4 | 28,6 | | | | | | |
| | 20h | 32,5 | 67,5 | | | | | | |
| 14. | 8h | | 96,4 | 0,6 | 0,3 | | | | 2,7 |
| | 20h | | 64,0 | 23,7 | 5,3 | 1,0 | | | 6,0 |
| 15. | 8h | | 17,9 | 16,8 | 16,2 | 36,1 | 6,9 | | 6,1 |
| | 20h | | 2,5 | 10,5 | 11,2 | 47,4 | 21,0 | 0,8 | 6,6 |
| 16. | 8h | | | 2,8 | 2,5 | 20,8 | 65,5 | 5,2 | 3,2 |
| | 20h | | | | | 16,5 | 55,6 | 20,7 | 7,2 |

Abb. 8 a-c, Erklärung siehe Seite 34 .

schnell wie die Proliferation in Gang kommt, wird sie beendet: Vom 14. Tag p.c., dem Höhepunkt der Teilungsaktivität, bis zum 15. Tag p.c., 20 Uhr treten alle weiblichen Keimzellen in die meiotische Prophase ein. Zur besseren Übersicht wurden die aufeinanderfolgenden Phasen der Oogenese in Abb. 8b noch stärker scheamtisiert dargestellt. Die in diesem Schema angegebene Dauer der einzelnen Abschnitte der meiotischen Prophase wurde von Crone et al. (1965) durch autoradiographische Untersuchungen bestimmt.

Die Dauer der Proliferationsphase der Oogonien beträgt 36 - 48 Stunden.
In diesem Schema wird auch deutlich, welch hohen Grad an Synchronisation in ihrer Entwicklung die Gesamtpopulation der weiblichen Keimzellen bei der weißen Maus hat.

Abb. 8: Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Oogonienproliferation und der meiotischen Prophase.

In Teil a) und c) der Abbildung ist der prozentuale Anteil der einzelnen Zellarten vom 13. bis zum 16. Tag p.c. und deren zeitliche Aufeinanderfolge abzulesen.

Die einzelnen Phasen der Oogenese vom 13. bis zum 16. Tag p.c. sind in Teil b) der Abbildung noch stärker schematisiert dargestellt. Die genauen Zahlen für die Zeitdauer der einzelnen Phasen (+) wurden den autoradiographischen Untersuchungen von Crone et al. (1965) entnommen.

3. Ergebnis der Photometrischen Messung

Die photometrische Messung der Silberkorndichte (SKD) über den markierten Zellkernen einer Gonade ergibt eine Reihe von Meßwerten (in willkürlichen photometrischen Einheiten), die in einer Summenprozentkurve dargestellt werden kann: Die Ordinate drückt die Prozente aus, die Abszisse den photometrischen Meßwert, der Einfachheit halber SKD (Silberkorndichte) genannt.
Die Meßreihen der Gonaden eines Termins (=Markierung/Tötung) konnten zusammengefaßt und in einer einzigen Summenprozentkurve (SPK) dargestellt werden.
Die Summenprozentkurven (SPK) einer Versuchsserie wurden in Abb.9 senkrecht untereinander angeordnet, so daß mit Verlängerung der Markierungsdauer die Abnahme der Silberkorndichte durch eine Rechtsverschiebung der Summenprozentkurven deutlich wird.

Die Teilung eines markierten Zellkerns führt im Autoradiogramm zur Halbierung seiner SKD. Im Idealfall sollte auch eine Summenprozentkurve nach einer Teilung eine Rechtsverschiebung um jeweils die Hälfte erfahren (in Abb. 10a die Kurven I, II, III, IV als Schema). Die tatsächlich erhaltenen Kurven weichen von diesen hypothetischen Kurven ab (vergl. die Kurven I - IV in Abb. 10a mit den Kurven der Abb. 9). Deshalb halten wir es für nötig, vorweg die möglichen Einflüsse zu diskutieren, die die Lage und die Form einer SPK (Summenprozentkurve) in unserer Versuchsanordnung bestimmen:
Die Steigungen der Kurven in Abb.9 von Organen mit einer Markierungsdauer von 24 Stunden und mehr sind flacher als die der SPK der Zellen mit einer Markierungsdauer von 60 Minuten, und auch weniger steil, als die hypothetischen Kurven (Abb. 10a, Kurven I - IV) erwarten ließen.
1) Dieser geringere Anstieg läßt sich einmal dadurch erklären, daß in einer Meßreihe SKD-Werte von Zellkernen mit unterschiedlichem "Verdünnungsgrad" enthalten sind; d.h. in solchen Meßreihen können Werte von Kernen enthalten sein, die sich nach Markierung z.B. zweimal, und solche von Zellkernen, die sich dreimal geteilt

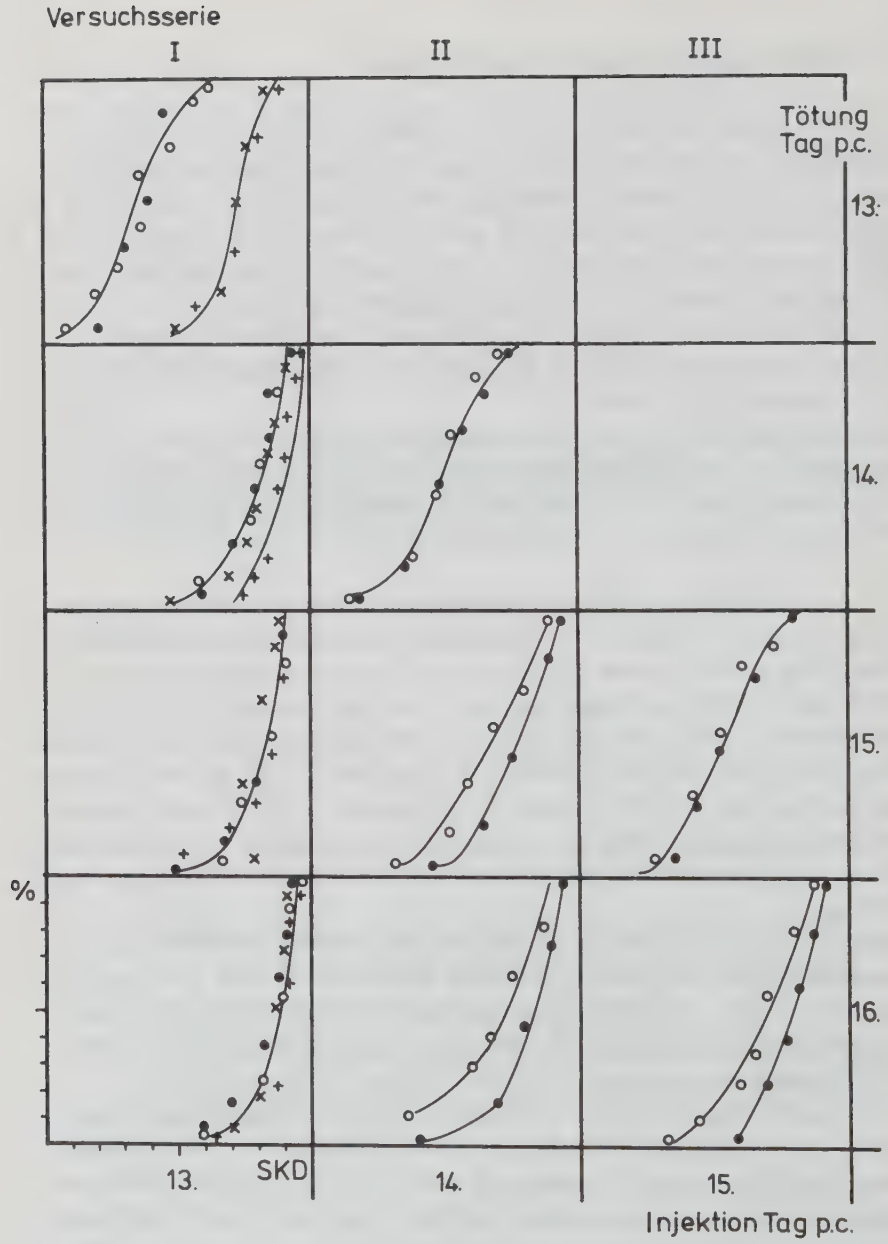



Abb. 9: Graphische Darstellung der Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchungen. (Zeichenerklärung siehe S. 37).

Zeichenerklärung zu Abb. 9:
Die photometrisch ermittelten Silberkorndichten (SKD) über den Kernen der Geschlechtszellen werden als Summenprozentkurve dargestellt; auf der Ordinate sind die Prozente, auf der Abszisse die photometrischen Meßwerte aufgetragen. Die Kurven einer Versuchsserie sind senkrecht untereinander angeordnet. Die Kurven der männlichen Tiere sind durch •, x gekennzeichnet, die der weiblichen Tiere durch o, +. In Versuchsserie I sind die abends getöteten Tiere (siehe auch Versuchsanordnung Abb. 2) an Kreuzen (x und +) zu erkennen.

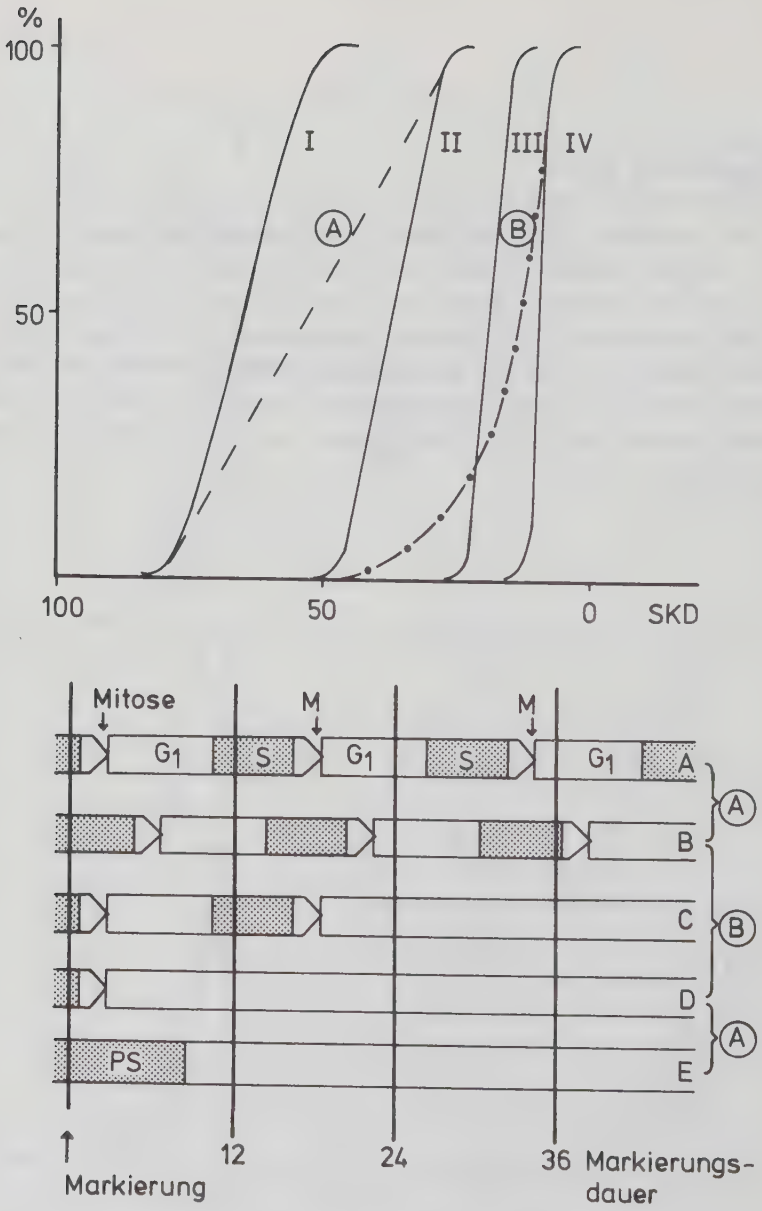



Abb. 10: Schematische Darstellung der Lage und Form von hypothetischen Summenprozentkurven der Silberkorndichten über den Kernen einer sich teilenden Zellpopulation.

haben. Dies ist möglich, da die einzelnen Zellzyklen zeitlich gegeneinander etwas versetzt sein können: Wenn, wie in Abb. 10b dargestellt, die Markierung bei Linie A in die späte, bei Linie B in die frühe S-Phase fällt, werden bei Tötung nach 36 Stunden zwei (Linie B) oder drei (Linie A) Teilungen abgelaufen sein. In solch einem Fall ergibt die gemeinsame Meßreihe beider Zellinien eine SPK wie sie in der Abb. 10a, Kurve (A) dargestellt ist.
2) Die gleiche Kurvenform (Abb. 10a, Kurve (A) ) kann aber auch entstehen, wenn ein Teil der Zellkerne sich nach Markierung mit 3H-TdR teilt (Zellinie D in Abb. 10b), in der gleichen Gonade sich Keimzellen zwar markieren, aber nach der Markierung nicht mehr teilen und damit auch ihre SKD nicht (Zellinie E in Abb.10b) mehr reduzieren.
3) Weiter gibt es den Fall, daß Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Markierung ihre mitotische Aktivität einstellen, sodaß die Meßreihe eines Organs, mit z.B. einer Markierungsdauer von 36 - 48 Stunden, SKD-Werte von Zellkernen enthält, die eine, zwei oder drei Teilungen durchlaufen haben (Zellinien B+C+D in Abb. 10b; vergl. die Kurve (B) in Abb. 11a mit den Kurven der Termine 13/14, 13/15 oder 13/16 in Abb. 10).
Die Breite und Steigung der Summenprozentkurven wird also durch die Zahl der abgelaufenen Teilungen und den jeweiligen Anteil der Zellen mit unterschiedlichen Teilungen bestimmt.

Unter diesen Voraussetzungen lassen sich die in Abb. 9 zusammengestellten Meßergebnisse in folgender Weise interpretieren:

1) Markierung am 13. Tag p.c. (Versuchsserie I, 1. senkrechte Spalte in Abb. 9). Im ersten Kurvenbild dieser Spalte sind die Summenprozentkurven der Organe mit der Markierungsdauer von 60 Minuten und von 12 Stunden dargestellt. Beide Kurven sind in der Form gleich; nach einer Markierungsdauer von 12 Stunden ist die SPK jedoch um einen Betrag nach rechts verschoben, der einer Halbierung der SKD über den Zellkernen dieser Organe entspricht. Dies bedeutet, daß sich alle markierten Zellen nach einer Markierungs-

dauer von 12 Stunden einmal geteilt haben. Nach einer Markierungsdauer von 24 Stunden (14. Tag p.c., 8 Uhr, 2. Diagramm) findet sich eine weitere Rechtsverschiebung der SPK, die einer Abnahme der SKD auf 1/4 des Ausgangswertes (= SKD nach einer Markierungsdauer von 60 Minuten) entspricht. Die Form der Kurven hat sich geändert: Sie entspricht der theoretischen Kurve (B) in Abb. 11a.

Die Form der SPK nach einer Markierungsdauer von 36 Stunden (14. Tag p.c., 20 Uhr, 2. Diagramm) ist identisch mit der vorigen; die SPK ist aber nochmals nach rechts verschoben, Die Abnahme der SKD liegt jetzt in etwa bei 1/8 des Ausgangswertes. Die Form dieser Kurve ist auch identisch mit denen der SPK nach noch längerer Markierungsdauer; es findet auch keine weitere Rechtsverschiebung mehr statt: Die SPK sind ab einer Markierungsdauer von 36 Stunden weitgehend deckungsgleich.

Die Rechtsverschiebung der Kurven bis zum späten 14. oder frühen 15. Tag p.c. entspricht einer Abnahme der SKD, die mit drei Teilungen der am 13. Tag p.c. markierten M-Prospermatogonien bzw. Oogonien in einem Zeitraum von 36 bis 48 Stunden zu erklären ist. Die Basis der SPK des 15. und 16. Tages p.c. ist schmal und die Steigung steil. Dies bedeutet, daß der größte Teil aller markierten Zellkerne die drei Teilungen am 13. und 14. Tag p.c. durchlaufen haben.
Die Kurven der männlichen und der weiblichen Gonaden sind zu allen Terminen identisch. M-Prospermatogonien und Oogonien sind gleich intensiv markiert und teilen sich gleich häufig.

2) Bei Markierung am 14. Tag p.c. (Versuchsserie II, 2. senkrechte Spalte in Abb. 9) zeigt die Summenprozentkurve des 15. Tages p.c. (also nach einer Markierungsdauer von 24 Stunden) eine Rechtsverschiebung, die einer Abnahme der SKD auf 1/2 bis 1/4 des Ausgangswertes (d.i. die SKD nach einer Markierungsdauer von 60 Minuten am 14. Tag p.c.) entspricht. Die SPK am 16. Tag p.c. (nach einer Markierungsdauer von 48 Stunden) stimmt in Form und Lage mit

der des 15. Tages p.c. weitgehend überein. Danach teilen sich also am 14. Tag p.c. markierte Zellkerne bis zum 15. Tag p.c. ein- bis zweimal. Der Anteil sich vom 15. bis zum 16. Tag p.c. noch teilender Zellen ist so gering, daß er die Lage der SPK am 16. Tag p.c. nicht entscheidend beeinflußt.
Für diesen Befund spricht auch die Form der beiden Kurven: Die Basis beider Kurven ist breit, die Steigung flach. Wie bereits in den Vorbemerkungen oben erläutert, kann die Abflachung dieser Kurven nur dadurch erklärt werden, daß in sie Werte von Zellen eingehen, deren Proliferation bereits beendet ist und damit Zelllinien vorhanden sind, die eine und solche, die zwei Teilungen (nach 24 Stunden Markierungsdauer) durchlaufen haben.
Die Kurven der männlichen und der weiblichen Tiere am 15. und am 16. Tag p.c. der Versuchsserie II unterscheiden sich: Die SPK der weiblichen Geschlechtszellen sind in der Steigung flacher und dadurch nicht soweit nach rechts verschoben. Diesen SPK entspricht eine Verdünnung der Silberkorndichten auf 1 - 1/2 - 1/4 des Ausgangswertes. In den Kurven der weiblichen Tiere sind also SKD-Werte von Zellkernen enthalten, die zwar 3H-TdR eingebaut, sich danach aber nicht mehr geteilt und damit auch ihre Silberkorndichte nicht reduziert haben.

3) Die Kurven bei Markierung am 15. Tag p.c. (Versuchsserie III, 3. senkrechte Spalte in Abb. 9) ähneln denen der Versuchsserie II. Wie bei den Markierungsindices bereits gesagt, markieren sich am 15. Tag p.c. etwa 10 % der männlichen und über 20 % der weiblichen Geschlechtszellen; am 16. Tag p.c. markiert sich bei beiden Geschlechtern keine Keimzelle mehr. Die in der 3. senkrechten Spalte der Abb. 10 enthaltenen Kurven repräsentieren also die letzten 24 Stunden der Gonienproliferationsphase, und erfassen nur noch einen geringen Anteil der Keimzellpopulationen.
Die SPK der M-Prospermatogonien am 16. Tag p.c. (24 Stunden Markierungsdauer) zeigt eine Verschiebung nach rechts, die einer Halbierung der SKD-Werte entspricht. Auch die SPK der weiblichen Geschlechtszellen zeigen eine Rechtsverschiebung, die jedoch - ebenso wie an den Terminen 14/15 und 14/16 - nicht soweit wie die

der männlichen Tiere geht. Die Steigung der Kurve der weiblichen Tiere ist flacher.
Die am 15. Tag p.c. markierten M-Prospermatogonien teilen sich also bis zum 16. Tag p.c. noch einmal. Von den markierten, weiblichen Keimzellen teilt sich ein Teil vom 15. bis zum 16. Tag p.c. einmal; der größere Anteil der weiblichen Keimzellen teilt sich nach Markierung mit 3H-TdR am 15. Tag p.c. nicht.

Die dargestellten Differenzen zwischen den Kurven der männlichen und denen der weiblichen Gonade entstehen offensichtlich durch Markierung von Oocyten in der prämeiotischen S-Phase.

Wie bereits bei der Besprechung des Markierungsindex erwähnt, markieren sich bei Applikation von 3H-TdR am 16. Tag p.c. weder bei männlichen noch bei weiblichen Tieren Geschlechtszellen. Der Mitoseindex beträgt bei beiden Geschlechtern am 15. Tag p.c., 20 Uhr fast 0 ‰. Die Gonienproliferationsphase wird also zwischen dem 15. und 16. Tag p.c. beendet.

Die prämeiotische S-Phase der Oocyten beginnt schon am 14. Tag p.c. Auch sie ist, wie der Markierungsindex am 16. Tag p.c. zeigt, zwischen dem 15. und dem 16. Tag p.c. beendet.

## IV. Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, näheren Einblick in die Gesetzmäßigkeiten der Proliferation von männlicher und weiblicher Geschlechtszelle während der Präspermatogenese und der Oogenese bei Feten der weißen Maus zu gewinnen.
Daß eine solche Proliferation während der pränatalen Gonadenentwicklung vieler Säuger eine regelmäßige Voraussetzung für den Eintritt der weiblichen Geschlechtszelle in das Oocytenstadium und in die Meiose darstellt, ist bereits seit langem bekannt (Peters, 1970). Erst die Untersuchungen, insbesondere von Hilscher et al. (1974), Hilscher et al. (1976) und Wartenberg (1976) haben gezeigt, daß die Oogonienproliferation zeitlich streng begrenzt ist, sich die Geschlechtszellen dieser Proliferationsphase morphologisch deutlich von ihren Vorläufern (primordiale Geschlechtszellen) unterscheiden und daß zum anderen eine identische, zeitlich begrenzte und durch einen besonderen Zelltyp ausgezeichnete Proliferationsphase parallel im pränatalen Hoden abläuft. Diese ist zwar zeitlich eng mit der Proliferation im Ovar gekoppelt, stellt aber im Gegensatz zu dieser nicht den initialen Mechanismus für den Eintritt in die Meiose dar.

Im einzelnen ergaben sich daraus folgende Probleme:
1) Inwieweit gleichen oder unterscheiden sich die pränatalen Proliferationsphasen von der entsprechenden Spermatogonienvermehrung, die vor Eintritt der männlichen Geschlechtszelle in die Meiose im Hodentubulus des erwachsenen Tieres abläuft?
2) Ist die Zahl der mitotischen Teilungen der weiblichen und der männlichen Geschlechtszellen in den embryonalen Gonaden gleich und
3) durchlaufen die Spermatogonien im adulten Hoden die gleiche Anzahl an Teilungen, wie die Oogonien im embryonalen Ovar bzw. die Prospermatogonien im embryonalen Hoden?

Grundsätzlich kann zu diesem Problem gesagt werden, daß jede der drei Arten von Proliferationsphasen sich in einem Kriterium von

den anderen beiden Formen unterscheidet. Die Proliferation der Prospermatogonien im embryonalen Hoden leitet im Gegensatz zu den beiden anderen Proliferationsarten nicht in die Meiose über. Die Proliferation der Spermatogonien im adulten Hoden ist ein ab der Pubertät ständig neu einsetzender Vorgang, während Oogonien- und Prospermatogonienproliferation einmalig sind; denn während eines begrenzten Zeitraumes erschöpft sich das Reservoir an "Stammzellen" (primordiale Geschlechtszellen), womit diese Phase beendet wird.
Das dritte Kriterium betrifft die Anzahl der mitotischen Teilungen. Durch die Untersuchungen von Oakberg (1956) und Monesi (1962; siehe auch Clermont, 1976) wissen wir, daß die Spermatogonien im adulten Hoden der Maus sich fünf- bzw. sechsmal teilen, bevor sie in die Meiose eintreten.
Die vorliegenden Untersuchungen haben nun gezeigt, daß die Teilungen der Oogonien und Prospermatogonien nicht so häufig sind. Beide Zelltypen durchlaufen je drei Teilungen. Die prämeiotische Proliferation ist also ein Prozeß, der in seiner Dauer von Faktoren beeinflußt wird, die in der pränatalen Periode und im adulten Hoden vorhanden sind, aber unterschiedlich lang wirken.

Dieses Ergebnis bedarf aber noch einer weiteren Erörterung. Zunächst muß nochmals betont werden, daß das Resultat durch eine Reihe von experimentellen Befunden, aber auch aufgrund einiger Indizien, die in die Beweisführung eingebaut wurden, zustande gekommen ist. So konnte die Generationszeit der Geschlechtszellen nur indirekt und mit einer gewissen Annäherung bestimmt werden. Sie wurde mit im Mittel 14 Stunden angenommen.
Unter dieser Voraussetzung lassen sich in der durch die Untersuchungen abgegrenzten Proliferationsphase rechnerisch nicht mehr als 3 Zellzyklen unterbringen.

In diesem Zusammenhang ist natürlich das Erfassen des Beginns der Proliferation wichtig. Aufgrund der histologischen Untersuchungen konnte der Beginn der Gonienproliferation bei der Maus auf die erste Hälfte des 13. Tages p.c. festgelegt werden. Mit der Markie-

rung am 13. Tag morgens trifft man die gerade gehäuft ablaufenden S-Phasen des ersten Teilungszyklus.

Problematisch ist der Übergang der primordialen Geschlechtszellen (Gonocyten) zu Oogonien bzw. M-Prospermatogonien. Erfolgt dieser Wechsel im Erscheinungsbild der Geschlechtszelle durch eine "Umdifferenzierung" oder durch eine "heterotypische" Zellteilung? Mit großer Wahrscheinlichkeit gehen zwei Oogonien bzw. Prospermatogonien aus einer Teilung eines Gonocyten hervor. So lassen sich am 12. Tag p.c. abends und auch am 13. Tag p.c. morgens nur wenige Gonien bzw. Gonienpaare feststellen, während am 13. Tag p.c. abends diese Zellform die überwiegende Zahl der zu beobachtenden Geschlechtszellen ausmacht.
Gleichzeitig läßt sich durch die autoradiographischen Untersuchungen nachweisen, daß während dieses 12-stündigen Zeitraums die Geschlechtszellen wenigstens eine Mitose durchlaufen.
Als erste der Proliferationsteilungen müssen wir also diejenige Mitose ansehen, durch die eine primordiale Geschlechtszelle zwei Gonien (Oogonien bzw. M-Prospermatogonien) liefert. Diese Teilung stellt den Eintritt in den synchronisiert und rhythmisch ablaufenden Proliferationsprozeß dar, der mit insgesamt drei Teilungen Clone von 8 Oocyten bzw. $T_1$-Prospermatogonien ergibt.

Die Beobachtung über den Beginn der Proliferationsphase am 13. Tag p.c. stimmt mit den Angaben von Chiquoine (1954) und Mintz (1959) überein, wonach bei der Maus am 12. Tag p.c. die Wanderphase der primordialen Geschlechtszellen abgeschlossen ist, die Sexualdifferenzierung beginnt und eine proliferative Phase der Geschlechtszellen einsetzt.

Über die Dauer der Proliferationsphasen sind Hinweise zunächst aus den Befunden über die Markierungs- und Mitoseindices möglich. Aber auch die Summenprozentkurven am 15. und 16. Tag p.c. zeigen, daß die Proliferation mit dem 15. Tag p.c. beendet ist. Bei der Maus ist die Gonienproliferation also auf einen Zeitraum von 36 bis maximal 48 Stunden zwischen dem 13. Tag p.c. morgens und dem 14.

Tag p.c. abends bzw. 15. Tag p.c. morgens beschränkt. Sie ist im Vergleich zu anderen Säugern extrem kurz. Einen Überblick über die Dauer der Oogonienvermehrung bei anderen Spezies gibt Peters (1970): Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Dauer der einzelnen Mitosefolgen nicht mit der Gesamtdauer der Proliferationsphase - also dem Zeitraum, in dem in einer Gonade Gonien in Proliferation gefunden werden - übereinstimmt. Bei der Maus treten innerhalb von 12 Stunden sämtliche vorhandenen primordialen Geschlechtszellen in die Proliferationsphase ein, die insgesamt etwa 48 Stunden dauert. Bei anderen Säugern ist die Phase, während der man Gonien in Proliferation findet, sehr viel länger. Beim Menschen teilen sich Oogonien zwischen dem 2. und 7. Monat der Embryonalentwicklung (Baker, 1963). Oocyten im Präleptotän sind aber auch am Ende des 2. Monats bereits zu beobachten. Daraus kann gefolgert werden, daß auch beim Menschen jede einzelne Oogonienproliferation auf wenige Zellteilungen beschränkt ist, aber der Eintritt in die Proliferation bis zum 7. Monat der Embryonalentwicklung erfolgen kann.

Das hier ermittelte Ergebnis von drei Teilungen der Oogonien bzw. Prospermatogonien bei der Maus stimmt mit den Ergebnissen bei der Ratte überein (Mauléon, 1967). Allerdings bleibt die Frage offen, ob alle Gonien sich gleich häufig teilen.
Der hohe Grad von Synchronisation des mitotischen Geschehens, den die histologischen Bilder vieler Gonaden zeigen, der eng begrenzte Zeitraum, der für die Proliferation zur Verfügung steht, und die identischen Formen der Kurven der Silberkorndichten vom Termin 13/14, 20 Uhr bis 13/16, 20 Uhr sprechen jedoch dafür, daß die Gonien bei der Maus überwiegend die gleiche Anzahl von (drei) Teilungen durchlaufen.
In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von Beaumont et al. (1962 und 1963) zu erwähnen. Sie untersuchten die Zunahme der Zahl der Keimzellen bei der Ratte während der Oogenese bzw. Präspermatogenese. Nach diesen Autoren wächst die Zahl von ca. 11500 weiblichen Keimzellen zum Zeitpunkt der Sexualdifferenzierung (das ist bei der Ratte der 14,5. Tag p.c.) während der folgenden

Proliferationsphase bis zum 18,5. Tag p.c. auf ca. 75 000 Zellen an. Im Hoden der Ratte sind am 14,5. Tag p.c. ca. 20 000 Keimzellen vorhanden, die sich bis zum 20. Tag p.c. auf eine Zahl von etwa 140 000 vermehren.
Während der Proliferationsphase der fetalen Gonaden der Ratte wird also bei beiden Geschlechtern die Zahl der Keimzellen verdreifacht. Allerdings sind am Ende der Proliferationsphase in der männlichen Gonade der Ratte doppelt so viele Keimzellen wie in der weiblichen zu finden. Dies ist jedoch nicht auf eine unterschiedliche Anzahl von Teilungen während der Gonienproliferation zurückzuführen. Die Geschlechtsunterschiede in der Zahl der Keimzellen bestehen schon zum Zeitpunkt der Sexualdifferenzierung, also vor Beginn der Gonienproliferationsphase. Die Ursachen dieser Differenz sind bis heute nicht bekannt. Beaumont et al. (1963) diskutieren eine höhere Mitoserate der primordialen Geschlechtszellen im genetisch männlichen Embryo während der Wanderungsphase. Als zweite Möglichkeit wird ein früheres Einsetzen der mitotischen Aktivität während der Wanderungsphase oder vor Beginn der Sexualdifferenzierung angenommen. Nach den Untersuchungen über das Verhalten der primordialen Geschlechtszellen während der Wanderung soll die mitotische Aktivität aber im Gegensatz zu den Verhältnissen bei vielen Vertebraten bei Säugern voll erhalten bleiben (Hardisty, 1967). Von einem "Einsetzen" der mitotischen Aktivität kann also nicht die Rede sein, wenn man nicht das Einsetzen der Proliferation der Gonien meint. Hier gibt es keine Geschlechtsunterschiede, wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen. Geschlechtsgebundene Differenzen der Keimzellzahlen bei verschiedenen anderen Spezies werden eingehend bei Hardisty (1967) diskutiert.

Man kann abschließend hervorheben, daß die Oogonien- bzw. M-Prospermatogonienproliferation im Gegensatz zu den 5 oder 6 Teilungen der Spermatogonienproliferation nur 3 Teilungen durchläuft.

## V. Zusammenfassung

An der weißen Maus wurden histologische und histoautoradiographische Untersuchungen zur Cytologie und Entwicklung der fetalen Gonade vom 12. Tag abends post conceptionem bis zum 16. Tag p.c. abends durchgeführt:

1) Die Sexualdifferenzierung der Gonade der weißen Maus findet während des letzten Drittels des 12. Tages p.c. oder der ersten Hälfte des 13. Tages p.c. statt.

2) Unmittelbar mit der Sexualdifferenzierung beginnt die Proliferationsphase der Oogonien bzw. der M-Prospermatogonien, die zwischen der 2. Hälfte des 14. Tages p.c. und der 1. Hälfte des 15. Tages p.c. zu Ende geht.
Die Proliferationsphase dauert 36 bis höchstens 48 Stunden.

3) Die autoradiographischen Untersuchungen zeigen, daß sich Oogonien als auch M-Prospermatogonien dreimal teilen.

4) Die Entwicklung von weiblicher und männlicher Gonade verläuft bei der weißen Maus bis zum Ende der Gonienproliferation parallel. Anschließend treten die Oocyten in die meiotische Prophase, die M-Prospermatogonien werden zu $T_1$-Prospermatogonien und verharren in einer $G_1$-Phase.

## VI. Literaturverzeichnis

Amlacher, E. : Autoradiographie in Histologie und Cytologie. G. Fischer-Verlag, Stuttgart (1974).

Baker, T.G. : A quantitative and cytological study of oogenesis in the rhesus monkey. J.Anat., 100, 761 - 776, (1966).

Baker, T.G. : Oogenesis and ovarian development. In: Reproductive Biology; Ed. H. Balin & S.R. Glaser; p.p. 398 - 437, Amsterdam: Excerpta Medica, (1972).

Baker, T.G. : Gametogenesis. Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 166, 13 - 41, (1972).

Baker, T.G. and Franchi, L.L. : The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. J.Cell.Sci., 2, 213-224, (1967).

Beaumont, H.M. and Mandl, A.M. : A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. Proc. Roy. Soc. Ser.B, 155, 557 - 579, (1962).

Beaumont, H.M. and Mandl, A.M. : A quantitative study of primordial germ cells in the male rat. J. Embryol.exp.Morph., 11, 715 - 740, (1963).

Böhm, N. : Einfluß der Fixierung und der Säurekonzentration auf die Feulgen-Hydrolyse bei 28 °C. Histochemie, 14, 201 - 211, (1968).

Böhm, N., Sprenger, E., Schlüter, G. und Sandritter, W. : Proportionalitätsfehler bei der Feulgen-Hydrolyse. Histochemie, 15, 194 - 203, (1968).

Borum, K. : Oogenesis in the mouse.
A study of meiotic prophase. Exp.Cell.Res. 24, 495-507, (1961).

Borum, K. : Oogenesis in the mouse. A study of the origin of the mature ova. Exp.Cell.Res., 45, 39 - 47, (1966).

Brambell, F.W.R. : The development and morphology of the gonads of the mouse. I. The morphogenesis of the indifferent gonad and the ovary. Proc.Roy.Soc.Ser.B, 101, 391 - 409, (1927).

Bustos-Obregon, E., Courot, M., Flechon, J.E., Hochereau- De-Reviers, M.T. and Holstein, A.F. : Morphological appraisal of gametogeneis. Spermatogenetic process in mammals with particular reference to man. Andrologia, 7, 141 - 163, (1975).

Challoner, S. : Studies of oogenesis and follicular development in the golden hamster. 1. A quantitative study of meiotic prophase in vivo. J. Anat., 117, 373 - 383, (1974).

Chiquoine, A.D. : The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. Anat.Rec., 118, 135 - 146, (1954).

Cleaver, J.E. : Thymidine metabolism and cell kinetics.
In: Frontiers of Biology, Vol. 6, ed. Neuberger, A. and Tatum, E.L., North-Holland Publishing Comp. Amsterdam, 1967.

Clermont, Y. : Cinétique de la spermatogénèse chez les mammifères. Arch.Anat.micr.Morph.exp., 56, Suppl. to No. 3-4, 7 - 60, (1967).

Crone, M., Levy, E. and Peters, H. : The duration of the premeiotic DNA synthesis in the mouse oocytes. Exp.Cell.Res., 39, 678 - 688, (1965).

Deimling, v.O., Witsch, K. und Rossner, R.: Methoden zur nachträglichen PAS- und Feulgen-Färbung bei entwickelten autoradiographischen Paraffinschnitten. Histochemie, 14, 242-250, (1968).

Dörmer, P. : Auflichtphotometrische Untersuchungen zur Größe der Koinzidenz in der Autoradiografie mit Tritium. Histochemie, 8, 1- 8, (1967).

Dörmer, P. : Erfahrungen mit der photometrischen Silberkornzählung in der Autografie.
LEITZ Mitt.Wiss.Techn., 4, 74 - 78, (1967).

Dörmer, P., Brinkmann, W., Stieber, A. und Stich, W. : Automatische Silberkornzählung in der Einzelzellautoradiografie. Eine neue photometrische Methode für die quantitative Autoradiografie. Klin.Wschr., 44, 477 - 482, (1966).

Everett, N.B. : Observational and experimental evidences relating to the origin and differentiation of the definitive germ cells in mice. J.Exp.Zool., 92, 49 - 91, (1943).

Falin, L.I. : The development of genital gland and the origin of germ cells in human embryogenesis. Acta anat., 72, 195-215, (1969).

Franchi, L.L. and Mandl, A.M. : The ultrastructure of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. Proc.Roy.Soc.Ser.B, 157, 99 - 114, (1962).

Franchi, L.L. and Mandl, A.M. : The ultrastructure of germ cells in foetal and neonatal male rats. J. Embryol.exp.Morph., 12, 289 - 308, (1964).

Gondos, B. and Zamboni, L. : Ovarian development: the functional importance of the germ cell interconnections. Fertil.Steril., 20, 176 - 189, (1969).

Graumann, W. : Zur Standardisierung des Schiff'schen Reagens. Z.wiss.Mikr., 61, 225 - 226, (1953).

Hardisty, M.W. : The numbers of vertebrate primordial germ cells. Biol.Rev., 42, 265 - 287, (1967).

Hilscher, B., Hilscher, W., Bülthoff-Ohnolz, B., Krämer, U., Birke, A., Pelzer, H. and Gauss, G. :
Kinetics of gametogenesis. I. Comparative histological and autoradiographic studies of oocytes and transitional prospermatogonia during oogenesis and prospermatogenesis. Cell.Tiss.Res. 154, 443 - 470, (1974).

Hilscher, B., Hilscher, W., Dellbrück, G. und Lerouge-Bernard,B. Autoradiographische Bestimmung der S-Phasen-Dauer der Gonozyten bei der Wistarratte durch Einfach- und Doppelmarkierung Z.Zellforsch., 125, 229 - 251, (1971).

Hilscher, W. and Hilscher, B. : Kinetics of the male gametogenesis Andrologia, 8, 105 - 116, (1976).

Hilscher, W. und Makoski, H.B. : Histologische und autoradiographische Untersuchungen zur "Prospermatognese" und zur "Spermatogenese" der Ratte. Z. Zellforsch., 86, 327 - 350, (1968).

Holstein, A.F. and Wartenberg, H. : On the cytomorphology of human spermatogenesis. Morphol. Aspects Androl., 1, 8 - 12, (1970).

Jean, C. : Developpement volumetrique des gonades du foetus de souris. C.R.Soc.Biol., 165, 2341 - 2345, (1971).

Kennelly, J.J. and Foote, R.H. : Oocytogenesis in the rabbits. The role of neogenesis in the formation of the definitive Ova and the stability of oocyte DNA measured with tritiated thymidine. Am.J.Anat., 118, 573 - 590, (1966).

Kingery, H.M. : Oogenesis in the white mouse. J.Morph., 30, 261 - 315, (1917).

Lang, W. und Maurer, W. : Zur Verwendbarkeit von Feulgengefärbten Schnitten für quantitative Autoradiographie mit markiertem Thymidin. Exp.Cell.Res., 39, 1 - 9, (1965).

Lennartz, K.J. und Maurer, W. : Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdoppelung und der Generationszeit beim Ehrlich-Aszitestumor der Maus durch Doppelmarkierung 14 C- und 3H-Thymidin. Z.Zellforsch., 63, 478 - 495, (1964).

Lima-De-Faria, A. and Borum, K. : The period of DNA synthesis prior to meiosis in the mouse. J.Cell.Biol., 14, 381 - 388, (1962).

Mauléon, P. : Cinétique de l'ovogenese chez les mammifères. Arch.Anat.micr.Morph.exp., 56, 125 - 150, (1967).

Mc Kay, D.G., Hertig, A.T., Adams, E.C. and Danziger, S. : Histochemical observations on the germ cells of the human embryos. Anat.Rec., 117, 201 - 219, (1953).

Mintz, B. : Continuity of the female germ cell line from embryo to adult. Arch.Anat.micr.Morph.exp., 48, 155 - 172, (1959).

Monesi, V. : Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. J.Cell.Biol., 14, 1 - 18, (1962).

Novi, A.M. : An electron microscopic study of the development of the rat testis in the first 10 postnatal days. Z.Zellforsch. mikr.Anat., 86, 313 - 326, (1968)

Nußbaum, M. : Zur Differenzierung des Geschlechts im Tierreich. Arch.Mikr.Anat., 18, (1880).

Oakberg, E.F. : Duration of the spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. Am.J.Anat., 99, 507 - 516, (1956).

Odor, D.L. and Blandau, R.J. : Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. I. Histogenesis and Organogenesis. Am.J.Anat., 124, 163 - 186, (1969).

Odor, D.L. and Blandau, R.J. : Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. II. Cytodifferentiation. Am.J.Anat., 125, 177 - 215, (1970).

Pelc, S.R. : The stripping-film technique of autoradiography. Int.J.appl.Radiat., 1, 172, (1956).

Peters, H. : Migration of gonocytes into the mammalian gonad and their differentiation. Phil.Trans.Roy.Soc.Lond.B., 259, 91 - 101, (1970).

Peters, H. : Intrauterine gonadal development. Fertil.Steril., 27, 493 - 500, (1976).

Peters, H. and Crone, M. : DNA synthesis in oocytes of mammals. Arch.Anat.micr.Morph.exp., 56, 160 - 170, (1967).

Peters, H., Levy, E. and Crone, M. : Deoxyribonucleic acid synthesis in oocytes of mouse embryos. Nature, 195, 915. (1962).

Peters, H., Levy, E. and Crone, M. : Oogenesis in rabbits. J.Exp.Zool., 158, 169 - 180, (1965).

Rogers, A.W. : A simple photometric device for the quantitation of silver grains in autoradiographs of tissue sections. Exptl.Cell.Res., 24, 228 - 239, (1961).

Ruby, J.R., Dyer, R.F. and Skalko, R.G. : The occurence of intercellular bridges during oogenesis in the mouse. J.Morph., 127, 307 - 339, (1969).

Rudkin, G.T. and Griech, H.A. : On the persistence of oocyte nuclei from fetus to maturity in the laboratory mouse. J.Cell.Biol., 12, 169 - 175, (1962).

Samuels, L.D. and Kisielski, W.E. : Toxicological studies of tritiated thymidine. Radiat.Res., 18, 620 - 632, (1963).

Sandritter, W., Jobst, K., Rakow, L. und Bosselmann, K. : Zur Kinetik der Feulgenreaktion bei verlängerter Hydrolysezeit. Cytophotometrische Messungen im sichtbaren und ultravioletten Licht. Histochemie, 4, 420 - 437, (1965).

Simkins, C.S. : On the origin and migration of the so-called primordial germ cells in the mouse and the rat. Acta zool.fenn., 4, 241 - 278, (1923).

Spiegelmann, M. and Bennett, D. : A light- and electron-microscopic study of primordial germ cells in the early mouse embryo. J.Embryol.exp.Morph., 30, 97 - 118, (1973).

Schultze, B. : Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm. In : Handbuch der Allgemeinen Pathologie, 2. Bd., V. Teil "Die Zelle" S. 466 - 668, (1968).

Vossmeyer, J. : Zur Cytologie der pränatalen Gonadenentwicklung beim Menschen. I. Die Histogenese des Hodens, an Eponschnitten untersucht. Z.Anat.Entwickl.-Gesch., 134, 146 - 164, (1971).

Waldeyer, W. : Eierstock und Ei - ein Beitrag zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Sexualorgane. Engelmann, Leipzig, 1870.

Wartenberg, H. : Spermatogenese-Oogenese: Ein cytomorphologischer Vergleich. Verh.Anat.Ges., 68, 63 - 92, (1974).

Wartenberg, H. : Comparative Cytomorphologic aspects of the mal germ cells, especially of the "Gonia". Andrologia, 8, 117 - 130, (1976).

Wartenberg, H., Holstein, A.F. und Vossmeyer, J. : Zur Cytologie der pränatalen Gonaden-Entwicklung. II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Cytogenese von Gonocyten und fetalen Spermatogonien im Hoden. Z.Anat.Entw.-Gesch., 134, 165 - 185, (1971).

Weakley, B.S. : Light and electron microscopy of developing germ cells and follicle cells in the ovary of the golden hamster: twenty four hours before birth to eight days post partum. J.Anat., 101, 435 - 459, (1967).

Wegener, K., Hollweg, S. und Maurer, W. : Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdopplungszeit und anderer Teilphasen des Zellzyklus bei fetalen Zellarten der Ratte. Z.Zellforsch., 63, 309 - 326, (1964).

Weismann, A. : Die Continuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung. Jena, Fischer 1885.

Winiwarter, H. de et Sainmont, G. : Nouvelles recherches sur l'ovogenèse et l'organogenèse de l'ovaire des Mammifères (Chat). Arch.Biol.Paris., 24, 1 et 165, (1909).

Witschi, E. : Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. Contr.Embryol. Carnegie Inst. 32, 67 - 80, (1948).

Zamboni, L. and Gondos, B. : Intercellular bridges and synchronisation of germ cells differentiation during oogenesis in the rabbit. J.Cell.Biol., 36, 276 - 282, (1968).

Zuckermann, S. : Origin and development of oocytes in foetal and mature mammals. In: C.R. Austin (ed) Sex differentiation and development. Mem.Soc.Endocrinol. 7, 63, (1960).

Herrn Professor Dr. H. Wartenberg
danke ich für die Überlassung des Themas und für
die freundliche Unterstützung und Beratung bei
der Ausführung dieser Arbeit.

## VII. Lebenslauf

Am 2. März 1946 wurde ich als Sohn von Dr. med. Josef Altmaier und Hildegard Altmaier, geb. Kurtenbach, in Bensberg geboren. Von 1952 bis 1955 besuchte ich in Merzig/Saar und in Saarwellingen die Volksschule, ab April 1957 das Staatliche Gymnasium (Humanistischer Zweig) in Saarlouis. Dort bestand ich am 4.3.1966 die Reifeprüfung.

Von April 1966 bis März 1968 war ich Soldat bei der Bundeswehr. Im Sommersemester 1968 begann ich an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn Medizin zu studieren. Am Ende des Wintersemesters 1968/69 bestand ich dort das Vorphysikum, am Ende des Sommersemesters 1970 das Physikum. Am 11.7.1974 bestand ich in Bonn die Ärztliche Prüfung.

Von August 1974 bis März 1976 war ich am Anatomischen Institut der Universität Bonn als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle angestellt. Anschließend absolvierte ich bis Oktober 1976 den klinischen Teil meiner Ausbildung als Medizinalassistent. Zum 1.11.1976 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.